

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Microbiología I**



**TESIS DOCTORAL**

**Biomarcadores predictivos en esclerosis múltiple**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Lidia Fernández Paredes**

**Directoras**

**Silvia Sánchez Ramón**  
**Rebeca Pérez de Diego**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I**



**TESIS DOCTORAL**

**Biomarcadores predictivos en esclerosis múltiple  
MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Lidia Fernández Paredes**

Directoras

Silvia Sánchez Ramón

Rebeca Pérez de Diego

**Madrid, 2017**

**Departamento de Microbiología I**  
**Facultad de Medicina**  
**Universidad Complutense de Madrid**

**Biomarcadores predictivos en esclerosis múltiple**

Memoria presentada por  
**Lidia Fernández Paredes**  
para optar al grado de Doctor  
por la Universidad Complutense de Madrid.

**DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Silvia Sánchez Ramón  
Doctora en Medicina.  
Servicio de Inmunología  
Hospital Clínico San Carlos

**CODIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Rebeca Pérez de Diego  
Doctora en Bioquímica.  
Departamento de Inmunología  
Universidad Complutense de Madrid  
Fundación para la Investigación  
Biomédica Hospital Universitario laPaz

Esta Memoria ha sido realizada gracias a la financiación concedida por el Fondo de Investigación Sanitaria (proyecto FIS#12/02759), la Fundación Ramón Areces (proyecto concedido en el XVII Concurso Nacional de Ayudas a la Investigación), y a los premios FIS (PI14/00616) y premio del XVII Concurso Nacional de Ayudas a la Investigación.

---

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN/SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>27</b>
<b>1. HISTORIA Y DEFINICIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>29</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>29</b>
2.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA	29
2.2. EDAD DE INICIO, DIMORFISMO SEXUAL DE LA ENFERMEDAD	30
<b>3. CURSO CLÍNICO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>31</b>
3.1. ESCALAS DE DISCAPACIDAD	32
<b>4. ETIOLOGÍA DE LA EM</b>	<b>33</b>
4.1. FACTORES DE RIESGO AMBIENTALES	33
4.2. FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS	37
4.3. EM FAMILIAR	40
4.4. GENETIC RISK SCORE	41
<b>5. DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	<b>42</b>
5.1. HALLAZGOS CLÍNICOS:	42
5.2. TESTS PARA CLÍNICOS	43
<b>6. FISIOPATOLOGÍA DE LA EM</b>	<b>46</b>
6.1. EL SISTEMA INMUNITARIO EN LA PATOLOGÍA DE LA EM	46
<b>7. SEÑALIZACIÓN POR PRRs Y EM</b>	<b>51</b>
<b>8. BIOMARCADORES EN EM</b>	<b>58</b>
8.1. BIOMARCADORES EN FLUIDOS BIOLÓGICOS:	58
8.2. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DIAGNÓSTICOS Y PRONÓSTICOS EN UN ESTUDIO TRANSVERSAL. RESULTADOS PREVIOS DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.	66
<b>9. TRATAMIENTOS EN EM</b>	<b>68</b>
9.1. TRATAMIENTOS DE PRIMERA LÍNEA: INMUNOMODULACIÓN	68
9.2. INHIBIDORES DE LA MIGRACIÓN LINFOCITARIA	69
9.3. FÁRMACOS INMUNOSUPRESORES	70
9.4. TRATAMIENTOS EN DESARROLLO	70
<b>OBJETIVOS</b>	<b>73</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>77</b>
<b>DISEÑO DE ESTUDIO</b>	<b>79</b>
<b>I. ESTUDIO DE BIOMARCADORES EN SUERO Y LCR</b>	<b>82</b>
<b>I.1. EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN PANEL DE CITOQUINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	<b>82</b>
<b>1. SUJETOS Y PERÍODO DE ESTUDIO</b>	<b>82</b>
<b>2. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS</b>	<b>83</b>
<b>3. ANÁLISIS MULTIANÁLITO POR TECNOLOGÍA LUMINEX</b>	<b>83</b>
<b>I.2. ESTUDIO DE DPP4 E ISOFORMAS DE IP-10</b>	<b>85</b>
<b>1. SUJETOS DE ESTUDIO</b>	<b>85</b>
<b>2. CUANTIFICACIÓN DE SDPP4</b>	<b>85</b>
<b>3. ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LA DPP4</b>	<b>86</b>

<b>4. ISOFORMAS DE IP-10</b>	<b>86</b>
<b>II. EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LA VÍA DE IFN-TIPO I</b>	<b>88</b>
<b>1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE TLR EN PBMCS</b>	<b>88</b>
1.1. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE TLR Y PROLIFERACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO	88
1.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE ARNm	90
<b>2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN</b>	<b>91</b>
2.1. ESTUDIO DE PRODUCCIÓN DE IFN-A Y TNF-A POR CÉLULAS DENDRÍTICAS	91
2.2. ESTUDIO DE PRODUCCIÓN DE IFN-B EN FIBROBLASTOS	91
<b>III. ESTUDIO DE EM FAMILIAR</b>	<b>93</b>
<b>1. SUJETOS DE ESTUDIO</b>	<b>93</b>
<b>2. EXTRACCIÓN DE ADN</b>	<b>94</b>
<b>3. SECUENCIACIÓN EXÓMICA COMPLETA (WES)</b>	<b>94</b>
<b>4. DETERMINACIÓN SNPs DE ESTUDIO</b>	<b>95</b>
<b>5. GENOTIPADO DE SNPs: SECUENCIACIÓN</b>	<b>95</b>
<b>6. CÁLCULO DE “UNWEIGHTED” Y “WEIGHTED” GENETIC RISK SCORE</b>	<b>97</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b>	<b>99</b>
<b>1. COMPARACIONES 2x2: TEST EXACTO DE FISHER</b>	<b>99</b>
<b>2. PRUEBAS NO PARAMÉTRICAS</b>	<b>99</b>
2.1 SIGNIFICANCIA GLOBAL: KRUSKALL-WALLIS	99
2.2 COMPARACIONES DE 2 MUESTRAS INDEPENDIENTES: U MANN-WHITNEY	99
2.3 ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES: CORRELACIÓN SPEARMAN	100
2.4 CURVAS DE RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO (CURVAS ROC)	100
<b>3. CORRECCIÓN ESTADÍSTICA</b>	<b>100</b>
<b>4. MODELO MULTIPARAMÉTRICO: ÁRBOL DE DECISIÓN</b>	<b>101</b>
 <b>ESTUDIO Y VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES EN SUERO Y LCR</b>	 <b>103</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.</b>	<b>105</b>
1.1. GRUPO DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE	105
1.2. GRUPO CONTROL	105
<b>2. DIFERENCIAS GLOBALES ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO</b>	<b>105</b>
<b>3. BIOMARCADORES CANDIDATOS PARA EL USO CLÍNICO AL INICIO DE LA SINTOMATOLOGÍA NEUROLÓGICA</b>	<b>108</b>
3.1. BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE	108
3.2. BIOMARCADORES QUE DISCRIMINAN ENTRE LAS FORMAS CLÍNICAS DE LA EM	113
3.3. MODELO DE ÁRBOL DE DECISIÓN PARA PREDECIR EL RIESGO DE EM	115
<b>4. ESTUDIO EN LCR</b>	<b>118</b>
4.1. EVALUACIÓN DE MARCADORES SOLUBLES	118
<b>5. ESTUDIO DE DPP E ISOFORMAS DE IP-10</b>	<b>125</b>
5.1. DPP4 SOLUBLE Y ACTIVIDAD DPP: DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DPP EN LCR DE PACIENTES CON EM	125
5.2. NIVELES DE LAS FORMAS AGONISTA Y ANTAGONISTA DE IP-10	127
 <b>EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LA VÍA DEL IFN-TIPO I</b>	 <b>129</b>
<b>1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE TLR EN PBMCS</b>	<b>131</b>
1.1. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE TLR Y PROLIFERACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO	131
1.2. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE TLR POR RT-PCR	132

<b>2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN</b>	<b>135</b>
2.1. ESTUDIO DE PRODUCCIÓN DE IFN-A Y TNF-A EN CDs	135
2.2. ESTUDIO DE PRODUCCIÓN DE IFN-B EN FIBROBLASTOS	135
<b><u>ESCLEROSIS MÚLTIPLE FAMILIAR</u></b>	<b><u>139</u></b>
<b>1. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EN DOS FAMILIAS CON EM</b>	<b>141</b>
1.1. SELECCIÓN SNPs DE ESTUDIO	141
1.2. SECUENCIACIÓN SNPs	141
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>147</u></b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>163</u></b>
<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b><u>167</u></b>
<b><u>ANEXOS</u></b>	<b><u>195</u></b>
<b><u>ANEXO I.</u></b>	<b><u>197</u></b>
<b><u>ANEXO II</u></b>	<b><u>198</u></b>



---

# **ABREVIATURAS**

<b>AUC</b>	Área bajo la curva ( <i>Area under the curve</i> )	<b>GRS</b>	<i>Genetic Risk Score</i>
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos básico ( <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> )	<b>GWAS</b>	Estudios de asociación de barrido genómico ( <i>Genome Wide Association Studies</i> )
<b>BHE</b>	Barrera Hematoencefálica	<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos ( <i>Hepatocyte Growth Factor</i> )
<b>BOC</b>	Bandas Oligoclonales	<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitario Humano ( <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
<b>CCL</b>	<i>C-C motif chemokine ligand</i>	<b>IFN</b>	Interferon
<b>CD (m/p)</b>	Célula dendrítica (mieloide/plasmacitoide)	<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>CIS</b>	Síndrome clínicamente aislado ( <i>Clinical Isolated Syndrome</i> )	<b>IL-</b>	Interleuquina
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígeno	<b>IL-1ra</b>	Antagonista del receptor de IL-1 ( <i>IL-1 receptor antagonist</i> )
<b>CS</b>	Controles sanos	<b>IP-10/ CXCL10</b>	Proteína inducible por IFN- $\gamma$ -10 ( <i>IFN-gamma-inducible Protein 10</i> )
<b>CXCL</b>	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>	<b>LAMP</b>	
<b>CXCR</b>	<i>C-X-C motif chemokine receptor</i>	<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>DPP</b>	Dipeptidil peptidase	<b>LGP-2</b>	Laboratorio de genética y fisiología 2 ( <i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i> )
<b>EAE</b>	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>	<b>MCP-1 /CCL2</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos-1 ( <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> )
<b>EBNA1</b>	Antígeno nuclear 1 del virus Epstein–Barr ( <i>EpsteinBarr virus nuclear antigen 1</i> )	<b>MDA5</b>	Proteína asociada a la diferenciación del Melanoma 5 ( <i>Melanoma Differentiation Associated protein 5</i> )
<b>EDSS</b>	Escala Expandida del Estado de Discapacidad ( <i>Expanded Disability Status Scale</i> )	<b>Mig/ CXCL9</b>	Monocina inducida por IFN-gamma ( <i>Monokine induced by gamma Interferon</i> )
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )	<b>MIP-1<math>\beta</math>/ CCL4</b>	Proteína inflamatoria de los macrófagos-1 ( <i>Macrophage Inflammatory Protein beta</i> )
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	<b>MRS</b>	Espectroscopia por resonancia magnética ( <i>Magnetic Resonance Spectroscopy</i> )
<b>EM</b>	Esclerosis Múltiple	<b>MSSS</b>	<i>Multiple Sclerosis Severity Score</i>
<b>EMPP</b>	EM Primaria Progresiva		
<b>EMRR</b>	EM Remitente Recurrente		
<b>EMSP</b>	EM Secundaria Progresiva		
<b>ENI</b>	Enfermedades neurológicas inflamatorias		
<b>ENNI</b>	Enfermedades neurológicas no inflamatorias		
<b>(u/w)</b>	( <i>unweighted/weighted</i> )		

<b>nK</b>	<i>Natural killer</i>	<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i>
<b>NMO</b>	Neuromielitis Óptica	<b>TMEV-IDD</b>	<i>Theiler's murine encephalomyelitis viru-induced demyelinating disease</i>
<b>NOD</b>	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos ( <i>Nucleotide-binding and Oligomerization Domain</i> )	<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral ( <i>Tumor necrosis factor</i> )
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 ( <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> )	<b>T<sub>Reg</sub></b>	Linfocitos T reguladores
<b>ODN</b>	Oligonucleótidos de citosina y guanina ( <i>Cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides</i> )	<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>OEN</b>	Otras enfermedades neurológicas	<b>VEB</b>	Virus Epstein-Barr
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>	<b>VEGF-A</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>PBMC</b>	Célula mononuclear de sangre periférica ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> )	<b>VHH-6</b>	Herpesvirus humano tipo 6
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )	<b>VVZ</b>	Virus varicela-zoster
<b>PET</b>	Tomografía de emisión de positrones ( <i>Positron Emission Tomography</i> )	<b>WES</b>	Secuenciación completa del exoma ( <i>Whole exome sequencing</i> )
<b>PRR</b>	Receptores de reconocimiento de patrones ( <i>Pattern Recognition Receptors</i> )		
<b>RANTES /CCL5</b>	Regulada en activación, linfocito-T normal expresado y secretado ( <i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i> )		
<b>RIG-I</b>	Retinoico inducible del gen I ( <i>Retinoicacid-Inducible Gene 1</i> )		
<b>RM</b>	Resonancia Magnética		
<b>ROC</b>	<i>Receiver operating characteristic</i>		
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central		
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un único nucleótido ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )		

---

# RESUMEN/SUMMARY

## INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune crónica del sistema nervioso central (SNC) en la que participan en distinto grado mecanismos de inflamación, desmielinización, daño axonal, neurodegeneración, gliosis y remielinización. La EM se clasifica en tres formas clínicas predominantes: remitente-recurrente (EMRR), primaria progresiva (EMPP) y secundaria progresiva (EMSP). A día de hoy, en ausencia de un biomarcador específico, el diagnóstico de EM suele retrasarse al requerir la aparición de un segundo brote clínico o una confirmación de diseminación en espacio y tiempo de las lesiones por técnicas de neuroimagen para poder confirmar el diagnóstico.

Uno de los mayores retos actuales es identificar biomarcadores capaces de reconocer y predecir el curso de la enfermedad en el paciente individual, que podría permitir el uso de estrategias terapéuticas más personalizadas, sobre todo en el caso de pacientes con formas progresivas, para los que actualmente no hay terapia disponible.

Basándonos en resultados previos que nos permitieron definir un panel de 12 analitos con capacidad diagnóstica y pronóstica, hemos llevado a cabo un estudio transversal al inicio de las manifestaciones neurológicas para validar la utilidad clínica del mismo. En el estudio se han identificado y validado una serie de biomarcadores con elevado poder diagnóstico y pronóstico, que proporcionan por un lado una herramienta de utilidad en la práctica clínica habitual, y por otro lado permiten explorar y conocer en mayor profundidad la fisiopatología de la enfermedad y las diferencias entre las fases progresivas y las predominantemente inflamatorias.

## OBJETIVOS

- I. Identificar y validar nuevos biomarcadores sanguíneos con poder diagnóstico para discriminar pacientes con EM frente a controles sanos (CS) y frente a pacientes con otras enfermedades neurológicas (OEN) inflamatorias (ENI) y no inflamatorias (ENNI), y con poder pronóstico para diferenciar entre formas clínicas de EM.
- II. Construir un algoritmo diagnóstico que sirva como herramienta sencilla en la práctica clínica habitual, que ayude en el diagnóstico precoz y diferencial de la EM.
- III. Caracterizar la expresión y actividad de la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) y las isoformas de IP-10/CXCL10 en pacientes con EM y determinar su posible implicación en la patogénesis de la enfermedad.

- IV. Identificar biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR) que puedan contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en las primeras fases de desarrollo de la esclerosis múltiple.
- V. Evaluar la funcionalidad de la vía de señalización del interferón (IFN) de tipo I en las distintas formas clínicas de EM para identificar posibles defectos funcionales en estos pacientes.
- VI. Identificar variantes genéticas en dos familias con EM familiar que sirvan como marcadores predictivos de EM, a través del cálculo del *Genetic Risk Score* (GRS).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Identificación y validación de biomarcadores en suero y LCR

Análisis multianálisis por tecnología Luminex: se evaluaron muestras de suero y LCR obtenidas al debut clínico de una cohorte de 89 pacientes con EM (74 EMRR y 15 EMPP), 97 individuos con OEN (59 ENNI y 38 ENI), y muestras de suero de 46 CS. Se analizó el valor diagnóstico y pronóstico de un panel de 12 biomarcadores que incluían citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, que demostraron valor diagnóstico y/o pronóstico en nuestro estudio transversal preliminar. Este análisis se realizó con la tecnología *Luminex xMAP* (Bio-Rad Laboratories).

Estudio de DPP4 e isoformas de IP-10: se evaluaron los niveles solubles (sDPP4) (*Human DPP4 Duo Set ELISA* (R&D Systems, UK)), la actividad de la enzima DPP4 (*DPP4-Glo™ protease Assay* (Promega)) y las isoformas de IP-10 (SiMoA (Quanterix)) en suero y LCR de 20 muestras representativas de cada uno de los grupos de estudio.

Análisis estadísticos: para evaluar diferencias globales entre grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, y para las comparaciones dos a dos el test de Mann-Whitney. La relación cuantitativa entre variables se determinó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) se emplearon para seleccionar el valor del punto de corte óptimo de aquellas variables significativas. La clasificación logística multivariante se llevó a cabo mediante un modelo de árbol de decisión. Para el cálculo de probabilidad se empleó el estadístico  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher y la magnitud de la fuerza de asociación se calculó mediante el *odds ratio* (OR).

## Evaluación funcional de la vía de IFN-tipo I

Estudio en sangre periférica: se evaluó la expresión de los receptores tipo Toll TLR 3, 7, 9 y de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  por citometría de flujo multiparamétrica en 8 pacientes con EMRR y 4 CS, tras cultivar las PBMCs en presencia de estímulos virales sintéticos [poly (I:C), ODN, LAMP, EBNA, VHH-6], y expresión de los TLRs 3, 7, 9 y MyD88 por PCR a tiempo real, en 4 pacientes con EM (2 EMRR y 2 EMPP) y 2 CS, en condiciones similares de cultivo.

Cultivo de fibroblastos primarios: se desarrollaron líneas de fibroblastos tras biopsia cutánea de 2 pacientes con EM y 1 CS. Se evaluó la producción de IFN- $\beta$  por ELISA (VeriKine-HSTM Human IFN Beta Serum (pbl assay science, USA)) tras su estimulación con péptidos virales sintéticos [poly I:C (pIC); pIC+lipofectamina; pIC+IFN- $\alpha$ ].

## Estudio genético de EM familiar

Se realizó la secuenciación del exoma completo con *Illumina HiSeq 2000*, en cuatro pacientes con EM pertenecientes a la misma familia. Se determinó el GRS de 9 SNPs seleccionados y analizados por secuenciación Sanger en un total de siete pacientes con EM y doce individuos sanos pertenecientes a dos familias con EM.

## RESULTADOS

### Identificación y validación de biomarcadores en suero y LCR

1. Biomarcadores diagnósticos: los niveles en suero de IL-7, IL-1ra, bFGF, Mig e IP-10 estaban significativamente disminuidos en pacientes con EM con respecto a individuos con OEN. Las curvas ROC demostraron que la IL-7 es el biomarcador con mejor relación de sensibilidad y especificidad (73% y 71%), seguidas del IL-1ra y bFGF, con una sensibilidad cercana al 80% y una especificidad en torno al 55% en el diagnóstico.

2. Biomarcadores pronósticos: las curvas ROC indican un buen funcionamiento de los biomarcadores IP-10, Mig y eotaxina para discriminar entre formas clínicas (AUC: 0,831,  $p<0,001$ ; AUC: 0,742,  $p=0,003$ ; AUC=0,745,  $p=0,003$ ). Valores menores de 494, 594 y 98 pg/ml respectivamente, muestran una sensibilidad de alrededor del 80% y una especificidad del 75% en todas ellas.

3. Modelo de árbol de decisión para predecir el riesgo de EM: el árbol de decisión es un modelo multivariante capaz de calcular el riesgo de EM basado en una combinación de biomarcadores. Este algoritmo diagnóstico incluyó únicamente determinaciones en suero para facilitar su utilidad clínica. Las variables que mejor predicen y clasifican a los pacientes con EM son la IL-7 e IP-10. Sólo considerando los niveles de IL-7 en suero, pacientes con EM y OEN se distribuyen de forma que niveles por debajo de 141 pg/ml representan el mayor riesgo de padecer EM (EMRR: 85,1%; EMPP: 80%) (OR=6,51; IC 95%: 3,08-13,97,  $p<0,001$ ), mientras que valores superiores a 141 pg/ml son raros en EM (EMRR: 14,9%, EMPP: 20%). La combinación de IL-7 e IP-10 supone una estimación del riesgo más precisa. Niveles de IL-7 menores a 141 pg/ml y de IP-10 menores a 570 pg/ml permiten identificar un grupo con el mayor riesgo de EMPP (OR=22; IC 95%: 2,65-481,68) con un 73% de pacientes EMPP representados. El algoritmo muestra una sensibilidad del 73,3% y una especificidad del 85,3% para el diagnóstico de pacientes EMPP, con una capacidad de descartar la enfermedad (VPN) del 97,3%.

4. Estudio en LCR: el estudio de biomarcadores en LCR revela una disminución en la concentración de IL-1ra, IL-7 y bFGF en EM comparado con individuos con OEN, al igual que se observa en suero. La EMRR muestra una disminución significativa de las quimiocinas Mig ( $p=0,005$ ) y RANTES ( $p=0,003$ ) comparado con ENI. Por su parte, los niveles de IL-1ra y Mig son significativamente menores en el grupo de EMPP comparado con EMRR ( $p<0,001$ ;  $p=0,006$ , respectivamente).

5. Estudio de DPP e isoformas de IP-10: en línea con nuestro estudio previo, se observa una disminución significativa en la actividad de DPP4 en el LCR de pacientes con EM, especialmente en aquellos con la forma EMRR con respecto al grupo de ENI (EMRR vs ENI:  $p=0,03$ ; EMPP vs ENI:  $p=0,04$ ). La sDPP4 en LCR está significativamente disminuida en la forma EMPP al comparar con el grupo ENI ( $p=0,007$ ). Los niveles de la forma agonista de IP-10 son indetectables en la mayoría de muestras, y no se observan diferencias en la concentración de la forma antagonista.

### **Evaluación funcional de la vía del IFN-tipo I**

En células mononucleares en sangre periférica se observó una disminución en la proporción de linfocitos T reguladores ( $T_{Reg}$ ) ( $CD4^+CD25^+$ ) en pacientes con EM con



respecto a controles sanos tras la estimulación con péptidos de los virus EBNA-1 y VHH-6, sugiriendo un defecto de inmunoregulación.

Se obtuvieron líneas primarias de fibroblastos de dos pacientes con EM y un control sano. La producción de IFN- $\beta$  está disminuida en fibroblastos del paciente con EMRR (4,3 pg/ml) tras la estimulación de TLR3 con su agonista sintético pIC, comparado con el CS y el paciente con EMPP (127,2 pg/ml y 151,8 pg/ml respectivamente). Tras la transfección de los fibroblastos con pIC (pIC+lipofectamina), la producción de IFN- $\beta$  fue parcialmente restaurada en el paciente EMRR. Sólo en el caso de la incubación con IFN- $\alpha$ , 24 horas antes de la incubación con el estímulo, se consiguieron niveles similares de IFN- $\beta$  en los tres grupos.

### **Estudio genético de EM familiar**

Se seleccionaron 9 SNPs asociados a riesgo de EM o en desequilibrio de ligamiento ( $r^2 \geq 0,8$ ) en las cuatro pacientes con EM familiar tras el estudio del exoma. El cálculo del GRS de estos 9 SNPs asociados con susceptibilidad a padecer EM no se asoció a predicción de riesgo de EM o el desenlace de la enfermedad ni en casos familiares ni individuales.

## **DISCUSIÓN**

### **Identificación y validación de biomarcadores en suero y LCR**

En este trabajo se ha desarrollado un algoritmo diagnóstico de utilidad en la práctica clínica habitual para la EM respecto a otras enfermedades neurológicas en el debut clínico, y a su vez permite predecir el curso clínico de la enfermedad. Entre los 12 biomarcadores estudiados con este propósito, IL-7 e IP-10 identifican con mayor precisión pacientes con EM y con EMPP, y descartar la enfermedad con mayor precisión. Los niveles de IL-7 en suero aportan el mejor valor de punto de corte para diferenciar entre pacientes con EM de aquellos con otras enfermedades neurológicas diferentes a ésta, e incluso entre formas clínicas, donde valores por debajo de 141 pg/ml suponen el mayor riesgo a EMRR. Tras considerar los niveles de un segundo biomarcador, IP-10, se consigue descartar EMPP con una alta especificidad, con un 73% de los pacientes con valores menores a 570 pg/ml. El elevado valor predictivo negativo de este algoritmo permite ampliamente descartar la enfermedad, sobre todo en aquellos pacientes con la forma clínica EMPP. Esta prueba, con una sensibilidad del

73,3 % y especificidad del 85,3% para el diagnóstico de estos pacientes, presenta una ventaja respecto a la determinación de las BOC en LCR, que tiene una especificidad de un 62,5%.

Existe buena concordancia entre el análisis univariante y multiparamétrico sobre el poder diagnóstico y pronóstico de IL-7 e IP-10, puesto que su análisis individual muestra el máximo valor de sensibilidad y especificidad para IL-7 como marcador diagnóstico (73,0% y 70,8%), y para IP-10 como biomarcador pronóstico independiente (80,0% y 77,0%). La utilización de todos estos biomarcadores como predictores independientes del diagnóstico (IL-7, IL-1ra, bFGF, Mig e IP-10); o pronóstico (Mig, IP-10, eotaxina) es una herramienta útil en la toma de decisiones del paciente individual.

El estudio de biomarcadores en LCR muestra un perfil inflamatorio llamativamente bajo en pacientes con EM, especialmente en aquellos con la forma EMRR. Estos niveles disminuidos de IL-7 y las quimiocinas Mig y RANTES, además de una baja actividad DPP4, en una enfermedad inflamatoria como la EM, podrían reflejar un defecto intrínseco de estas vías, que podrían ser relevantes en la fisiopatología de la enfermedad, y claves en el desarrollo de una respuesta autoinmune.

### **Evaluación funcional de la vía de IFN-tipo I**

La desregulación en la vía del IFN tipo I podría suponer un nuevo enfoque en el conocimiento de la patogenia de la EM. Nuestros resultados, aunque preliminares, podrían indicar la existencia de una respuesta inmunológica deficitaria frente a infecciones virales a través de la vía del TLR3. La estimulación de TLR3 en modelos animales de EM ponen en evidencia su importancia en la inmunoregulación de la EM al suprimir la enfermedad a través de la secreción de IFN- $\beta$ .

### **EM familiar**

En contraste a nuestra hipótesis de trabajo, por la que se esperaba que la agregación familiar de casos EM fuera asociada a una carga genética mayor para ciertos alelos de riesgo descritos, nuestro estudio genético no demostró utilidad en la estratificación del riesgo a EM, y no hay evidencias de que se pudiese extrapolar a otros individuos fuera de esta familia.

## CONCLUSIONES

1. El modelo de árbol de decisión construido por primera vez con dos biomarcadores en suero al inicio de la enfermedad neurológica permite discriminar con la mayor especificidad tanto pacientes afectados con EM estudiados conjuntamente, como diferenciar específicamente aquellos afectados con la forma EMPP.
2. El uso del árbol de decisión con IL-7 y Mig en la práctica clínica habitual aportaría un valor añadido a la determinación de BOC en el diagnóstico de individuos con la forma EMPP, donde la especificidad no llega a ser superior al 60%, hasta alcanzar una especificidad del 85,3%.
3. El estudio individual de biomarcadores valida la IL-7, IL-1ra y Mig e incluye IP-10 y bFGF como biomarcadores sanguíneos de utilidad en el diagnóstico de EM. Además, los niveles de IP-10, Mig y eotaxina en sangre tienen claras implicaciones pronósticas en pacientes con EM.
4. La actividad de DPP4 está significativamente disminuida en LCR de pacientes con EM al inicio de la enfermedad.
5. En el estudio de la fisiopatología, la disminución de la IL-7 parece ser específica de la enfermedad en las primeras fases de desarrollo frente a otras enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias.
6. Resultados preliminares del estudio de la vía de IFN-tipo I en fibroblastos muestra un defecto en la funcionalidad de la vía del TLR3 en pacientes con EMRR en respuesta a estímulos virales. Este estudio requiere su confirmación con mayor número de pacientes.
7. El GRS calculado a partir de los 9 SNPs de riesgo asociados a EM no muestra utilidad en la estratificación del riesgo a EM, ni en su pronóstico en 2 familias estudiadas, y no hay evidencias de que se pueda extrapolar a otros individuos fuera de esta familia.

## INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is considered an immune-mediated disease of the central nervous system (CNS). Different mechanisms of inflammation-demyelination, axonal damage, neurodegeneration, gliosis and remyelination-repair combine together in various degrees. Thus, its clinical course varies greatly, as with the response to therapies, creating a unique clinical result for each patient. Even so, MS is predominantly classified into three clinical forms: relapsing-remitting MS (RRMS), primary progressive (PPMS) and secondary progressive (SPMS). To date, in the absence of a more specific biomarker, MS diagnosis and the start of treatment is often delayed after a second clinical relapse or after confirming neuroimage dissemination of lesions in space and time. Our particular efforts in the last years have been focused on the search of a constellation of few relevant biomarkers able to predict the clinical form of MS from a personalized approach and explain the physiopathological processes that are taking place, especially at the beginning of MS. In summary, this study has contributed to the identification and validation of novel biomarkers related with type I interferon (IFN) signaling pathways which may provide useful tools for the classification of the different clinical forms of MS and to explore the pathophysiological differences between the progressive and the recurrent-remitting phase of the disease.

## OBJECTIVES

1. Identification and validation of novel blood biomarkers for MS diagnosis and prognosis, comparing with patients with other neurological diseases (OND) (both inflammatory (IND) and non-inflammatory (NIND)) and healthy controls (HC), and which are able to stratify MS patients according to their clinical form (RRMS vs PPMS).
2. Development of a practical tool (decision-tree model algorithm) to aid in the differential diagnosis and prognosis of MS, with the goal of facilitating and improving the management of MS patients in clinical practice.
3. Characterization of dipeptidil peptidase 4 (DPP4) expression and activity in MS patients, as well as their product IP-10 isoforms in order to test that this enzyme plays a role in the pathophysiology of the disease.
4. Identification of novel cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers to provide mechanistic insight of MS pathophysiology.

5. Identification of functional defects in peripheral and central type I IFN signaling pathways in the different clinical forms of MS patients.
6. Study of a genetic risk score (GRS) to assist in diagnosis of the disease in two families with MS.

## METHODS

### Identification and validation of novel serum and CSF biomarkers

*Multiplex assay:* Serum and CSF samples at onset diagnosis from 89 MS patients (74 RRMS and 15 PPMS), 97 individuals affected with OND (59 NIND and 38 IND), and serum samples of 46 voluntary age-matched HC. We tested a total of 12 putative biomarkers among cytokines, chemokines and growth factors with diagnostic and/or prognostic value based in our preliminary results by the Luminex xMAP technology (Bio-Rad Laboratories).

*DPP4 levels/activity and IP-10 isoforms:* Soluble DPP (sDPP) 4 levels (human DPP4 Duo Set ELISA (R&D Systems, UK)), DPP4 activity (DPP4-Glo™ protease Assay (Promega)) and IP-10 isoforms (SiMoA technology (Quanterix)) were measured in 20 representative samples in each of the clinical groups.

*Statistical analysis:* Kruskal-Wallis rank sum test for multiple comparisons and Mann-Whitney test for pairwise comparisons were used. Correlations were assessed using Spearman correlation (rs) coefficients. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to select the optimal cut-off values of significant variables. Binary classification and regression tree model was performed to predict or classify an individual between different disease groups. Based on these results, Pearson's chi-squared test ( $\chi^2$ ) measured the association (contingency) between two variables. Fisher's exact test was performed when sample sizes were small (less than 5). The Odds ratio (OR) measured the strength of association.

### Functional characterization of type I interferon signaling pathway

*Peripheral blood study:* Multiparametric flow cytometry was performed to evaluate TLR3, 7, 9, IFN- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  expression after synthetic viral peptides stimulation in PBMCs from 8 RRMS. On the other hand, TLR3, 7, 9 and MyD88 expression were evaluated after similar conditions by real-time PCR in PBMCs from 4 MS patients (2 RRMS and 2 PPMS).

Skin fibroblasts culture: IFN- $\beta$  production was evaluated by the commercial ELISA kit VeriKine-HSTM Human IFN Beta Serum ELISA Kit (pbl assay science, USA) in fibroblasts from 2 MS patients (1 RRMS and 1 PPMS) after synthetic viral peptides stimulation (poly I:C (pIC); pIC+lipofectamine; pIC+IFN- $\alpha$ ).

### **Familiar MS study**

Whole exome sequencing was performed with an Illumina HiSeq 2000, in four MS patients belonging to the same family. SNPs pre-selected from the previous analysis were tested by Sanger sequencing in seven MS patients and twelve healthy relatives from two MS familial cases and GRS was determined.

## **RESULTS**

### **Identification and validation of novel blood and CSF biomarkers**

1. Diagnostic biomarkers: IL-7, IL-1ra, bFGF, Mig and IP-10 showed significantly lower levels in serum of MS patients with respect to the neurological control groups. The ROC curves indicate a good performance for IL-7 in MS diagnosis with the best sensitivity and specificity (73% and 71% respectively). IL-1ra and bFGF showed sensitivity around 80%, but lower specificity ( $\approx 55\%$ ) for MS diagnosis.

2. Prognostic biomarkers: ROC curves indicate a good performance of serum levels of IP-10, Mig and eotaxin for the discrimination of RRMS and PPMS (AUC: 0.831,  $p < 0.001$ ; AUC: 0.742,  $p = 0.003$ ; AUC=0.745,  $p = 0.003$ ). Cut-off values of 494.0, 594.4 and 98.2 pg/ml respectively, showed a sensitivity around 80% and a specificity around 75% for MS diagnosis.

3. New Decision-tree Model for MS: Decision-tree is a multivariate model able to calculate risk of MS based on combinations of biomarkers. This approach included only serum determinations and serum IL-7 and IP-10 were the strongest analytes for MS prediction and classification. Only taking into account IL-7 levels, risk of MS was the highest (odds ratio (OR=6.51; 95% CI: 3.08-13.97) for values below 141 pg/ml (RRMS: 85.1%, PPMS: 80%), whilst values above this cut-off are rare in MS (RRMS: 14.9%; PPMS: 20%). Combination of IL-7 and CXCL10 biomarkers assure more accurate individual and cumulative risk estimation. Thus, serum IL-7  $< 141$  pg/ml together with CXCL10  $< 570$  pg/ml represent the highest risk of PP-MS (OR=22; 95% CI: 2.65-481.68) with the 73% of PP-MS patients. This practical tool provides high sensitivity

and specificity values (73.3% and 85,3%) for PPMS diagnosis, with a high accuracy excluding the disease (negative predictive value: 97,3%).

4. *CSF Biomarker' Signature in MS*: CSF study showed significantly diminished concentrations of IL-1ra, IL-7 and bFGF in MS with respect to OND, similarly to serum findings. New dysregulated analytes, the chemokines Mig and RANTES, showed significantly diminished levels especially in the RRMS group compared to the corresponding IND control group ( $p=0.003$ ;  $p=0.005$ , respectively). Moreover, IL-1ra and Mig showed a significant decrease in PPMS compared to RRMS ( $p<0.001$ ;  $p=0.006$  respectively).

5. *sDPP4 levels, DPP4 enzymatic activity and IP-10 isoforms in MS patients*: the most striking finding was the diminished trend in CSF DPP4 activity of MS patients, especially in those affected of RRMS respect to the group of IND (RRMS vs IND:  $p=0.03$ ; PPMS vs IND:  $p=0.04$ ). Differences in CSF sDPP4 levels were detected only in the progressive MS group when comparing with the IND group ( $p=0.007$ ). On the other hand, most of samples had undetectable levels of the agonist CXCL10, and no differences in the antagonist concentrations were observed.

### **Functional characterization of type I interferon signaling pathway**

*Pheripheral blood analysis*: A diminished proportion of T<sub>Reg</sub> cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) was observed in MS patients after stimulation with EBNA-1 and VHH-6 peptides.

*Skin fibroblasts culture*: IFN- $\beta$  production was substantially diminished in fibroblasts from the RRMS patient (4.3 pg/ml) after TLR3 stimulation with the synthetic agonist pIC compared to HC and PPMS patients (127.2 pg/ml; 151.8 pg/ml respectively). After pIC transfection with lipofectamine, IFN- $\beta$  production was partially restored in RRMS patient. Complete normalization of IFN- $\beta$  levels was resolved solely after previous incubation of fibroblasts with IFN- $\alpha$ .

### **Familiar MS study**

Nine SNPs strongly associated with MS were selected for the GRS study. Two of them were identified in the WES and coincided with those previously described in the literature for conferring risk to MS and the remaining seven were at linkage disequilibrium ( $r^2 \geq 0,8$ ). In our patients with familiar history of MS, GRS did not predict the risk or outcome for MS neither in family nor in individual cases.

## DISCUSSION

### Identification and validation of novel blood and CSF biomarkers

Our findings present a new practical algorithm, with a potential role in MS diagnosis and prognosis as shown in a large series of patients with diverse inflammatory and non-inflammatory neurological manifestations at disease onset. Among candidate biomarkers studied for this purpose, IL-7 and IP-10 seems to mark large differences in risk stratification with the best accuracy. This combination of serum biomarkers is the best approach to define a patient-specific signature. Serum IL-7 establishes the best cut-off level to discriminate patients with MS, especially those affected by the progressive form, since levels above the cut-off of 141pg/ml are associated with very low probability of showing this clinical form. Moreover, considering a second biomarker, IP-10, we were able to discard PPMS with a high specificity, as 73% of PPMS patients had values <570 pg/ml. The high negative predictive value from this algorithm allows us to discard MS with good accuracy, especially those with PPMS. The high sensitivity (73.3%) and especially remarkable specificity (85.3%) for PPMS patients add advantages over the OCB determination (62.5% specificity). There is good agreement between univariate and multiparametric analysis on IL-7 and IP-10 diagnosis and prognosis values for MS. IL-7 is the best independent predictor of MS, with the best relation of sensitivity and specificity (73.0% y 70.8%), and IP-10 has the highest prognostic value (80.0% y 77.0%).

We confirm and extend previous observations providing that IL-7, IL-1ra, bFGF, Mig and IP-10 are good independent predictors of MS diagnosis. Mig, IP-10 or eotaxin provide an added value for prognosis during relapsing and progressive phases of MS.

CSF biomarkers of intrathecal inflammation and regeneration show a low proinflammatory signature in MS patients, especially in those with RRMS. Counterintuitive low levels of IL-7, and the chemokines Mig and RANTES, together with the low DPP4 activity in an inflammatory disease as MS suggest an intrinsic defect of these pathways that could be relevant in the pathophysiology of the disease and key in the development of an autoimmune response.

### Functional characterization of type I interferon signaling pathway

Dysregulation of the IFN type I signature could draw a new landscape to understand the onset of MS. Preliminary results here exposed could point to a defective



immune response to viral infections through their TLR3 signalling pathway. Our preliminary results might suggest a defect to TLR3 response, which could be compensated in the periphery.

### **Familiar MS study**

In contrast to our working hypothesis by which familiar aggregation of MS cases would be associated with a greater genetic load for risk alleles, our genetic study did not predict the outcome of MS in familial cases or predict risk for individual MS cases.

### **CONCLUSIONS**

1. Decision tree model combining IL-7 and IP-10 serum levels at the beginning of neurological disease allowed discrimination with the greatest accuracy both MS patients and discard PPMS with a high specificity.
2. The algorithm proposed provides an added value to PPMS diagnosis, showing advantages over the OCB determination in CSF.
3. Independent analysis validate IL-7, IL-1ra and Mig, and includes IP-10 and bFGF as serum diagnostic biomarkers for MS with a high discriminative power. Mig and IP-10 serum levels, together with eotaxin, show clear prognostic implications in MS patients, and lower levels are predominant in PPMS.
4. DPP4 activity is reduced in CSF from MS patients at clinical onset.
5. CSF pathophysiological approach point to IL-7 as a specific marker for MS, with diminished levels in CSF of MS at the beginning of the disease.
6. Preliminary data show a functional defect in TLR3 response to viral peptides leading to a diminished IFN- $\beta$  production in RRMS.
7. GRS combining nine SNPs previously identified as risk factors in MS did not predict risk in two families with MS studied.

---

# INTRODUCCIÓN

## **1. Historia y definición de la esclerosis múltiple**

La primera descripción de la esclerosis múltiple (EM) como entidad clinicopatológica se realizó hace aproximadamente 130 años, cuando el neurólogo francés Jean-Martin Charcot describió detalladamente una entidad nosológica que denominó “esclerosis en placas”, con aspectos clínicos y evolutivos de la enfermedad que correlacionaban con los hallazgos histológicos. Con el tiempo y un mayor conocimiento de la histopatología de la enfermedad, esta definición ha ido evolucionando desde “esclerosis diseminada” aludiendo a la diseminación espacial de las lesiones, hasta “esclerosis múltiple”, denominación más empleada en la bibliografía anglosajona, y que hace referencia a la existencia de lesiones múltiples en el sistema nervioso central (SNC) y a la aparición habitual de episodios múltiples de disfunción neurológica (1).

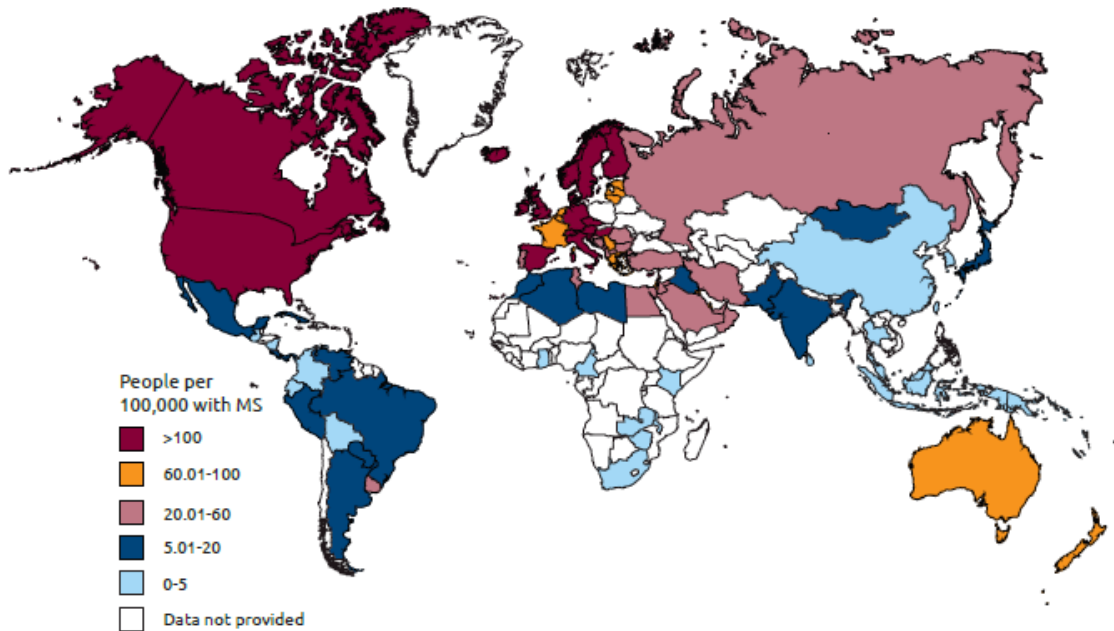
Hoy en día, la EM se define como una enfermedad autoinmune crónica que afecta al SNC y que representa la causa más frecuente de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes (2). La enfermedad se caracteriza por la ruptura y pérdida de la vaina de mielina que rodea a los axones en el cerebro y la médula espinal, con aparición de lesiones multifocales en la sustancia blanca, degeneración axonal y disfunción neurológica progresiva. Los síntomas más comunes incluyen alteraciones visuales, pérdida de equilibrio y coordinación, espasticidad, alteraciones sensoriales, incontinencia urinaria e intestinal, dolor, debilidad, fatiga y parálisis (1). Esta enfermedad compromete por tanto la calidad de vida de los pacientes y sus familias y tiene un gran impacto social y económico.

## **2. Epidemiología**

### **2.1. Incidencia y prevalencia**

Según los datos publicados en el Atlas de EM presentado por la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple en 2013, el número de personas afectadas por la enfermedad asciende a 2,3 millones, con una prevalencia mundial de 33 afectados por cada 100.000 habitantes. La distribución mundial de la EM se establece como un gradiente Norte-Sur (Figura 1). Actualmente, las zonas de alta prevalencia presentan tasas superiores, con aproximadamente 140 casos por 100.000 habitantes en el Norte de Europa (incluida España), Norteamérica, el sur de Australia y Nueva Zelanda.

Conforme se va disminuyendo en latitud, se observa una disminución en la prevalencia con un número de entre 5 y 30 casos por cada 100.000 habitantes. Las zonas de baja prevalencia no alcanzan los 5 casos por 100.000 habitantes y se sitúan en ciertos países asiáticos, África y zonas de Latinoamérica (2).



**Figura 1.** Distribución geográfica y prevalencia mundial de la EM. Figura extraída del Atlas de EM del MSIF (2).

## 2.2. Edad de inicio, dimorfismo sexual de la enfermedad

Aunque el debut de la enfermedad puede producirse en un amplio rango de edad (desde los 14 hasta los 55 años), la edad media de aparición de los primeros síntomas está en torno a los 30 años (3). Esta edad de inicio varía notablemente según la forma de presentación y la evolución de la enfermedad.

Al igual que en otras enfermedades de etiología autoinmune, la EM afecta más frecuentemente a mujeres que a hombres, en una proporción de 2:1 (4), aunque este ratio aumenta en casos de comienzo precoz de la enfermedad y en algunas poblaciones como la canadiense, japonesa, finlandesa, iraní y sarda que han llegado a alcanzar un ratio de 3:1 en las últimas décadas (5–9). Este dimorfismo sexual presente en EM y en la mayoría de enfermedades autoinmunes podría estar relacionado con la modulación inmunológica por las hormonas sexuales, que puede explicarse por la diferente expresión de receptores de hormonas sexuales en las células del sistema inmune, que es diferente en proporción y distribución en función del sexo del individuo (10). Además,

los cambios hormonales asociados a la menopausia y embarazo se han relacionado con una disminución en la frecuencia de brotes, por lo que las hormonas sexuales y su papel en la regulación del sistema inmune podrían desempeñar un papel muy importante en esta patología (11,12). Aunque más frecuente en mujeres, la EM suele tener peor pronóstico en hombres.

### **3. Curso clínico de la esclerosis múltiple**

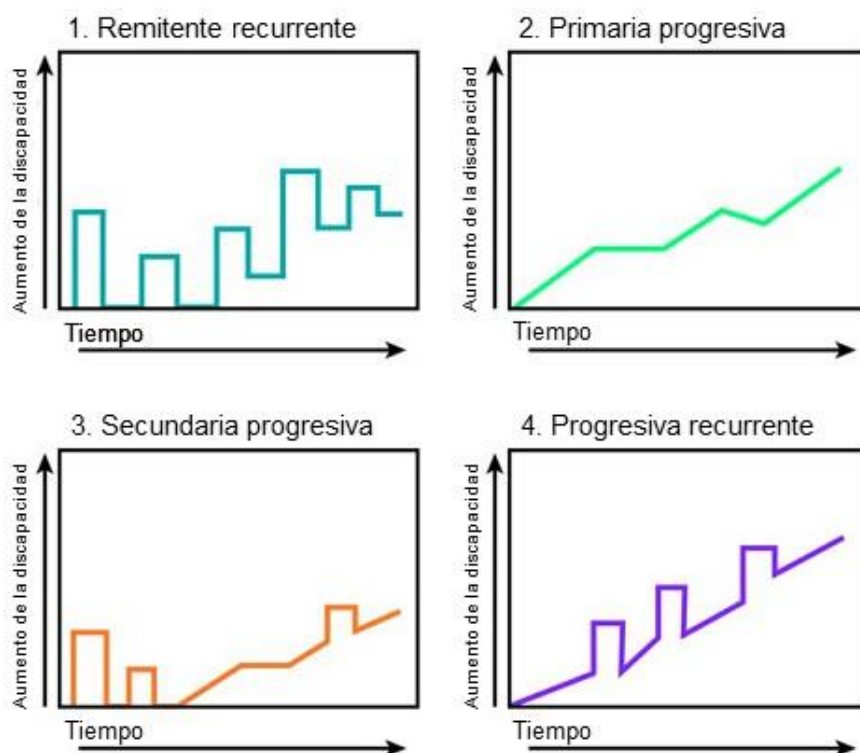
El curso clínico de la EM es muy variable entre individuos afectados y se clasifica predominantemente en cuatro formas clínicas, aunque sólo tres de ellas son habitualmente utilizadas en la práctica clínica habitual (13,14) (Figura 2):

-EM Remitente Recurrente (EMRR): es la forma clínica más frecuente, presente en el 85% de los pacientes. Se caracteriza por la alternancia de brotes neurológicos agudos seguidos de períodos de recuperación clínica total o parcial (remisión). La edad de debut se sitúa en torno a los 28-30 años.

-EM Secundaria Progresiva (EMSP): Tras un período aproximado de 10 años desde el debut con la forma EMRR, el 50-65% de los pacientes desarrollan esta forma clínica en la que el empeoramiento clínico se hace progresivo, los brotes desaparecen y se produce un deterioro neurológico severo.

-EM Primaria Progresiva (EMPP): Aparece en el 10-15% de los pacientes y es la forma con peor pronóstico. Se caracteriza por un empeoramiento progresivo de la discapacidad desde el inicio de la enfermedad, con ausencia de brotes. La edad de debut en este caso es de 40 años y el ratio mujer:hombre se invierte.

-EM Progresiva Recurrente (EMPR): Es la forma más agresiva donde los pacientes experimentan una progresión gradual desde el inicio, pero con aparición de uno o más brotes a lo largo de la evolución de la enfermedad. Afecta aproximadamente al 5% de los pacientes, pero no es habitualmente empleada para categorizar a los enfermos con EM.



**Figura 2.** Curso clínico de la EM. La línea representa la forma de progresión de la enfermedad, continua en la forma EMPP, con presencia de brotes (figuras rectangulares) en la forma EMRR, y una combinación de ambas en las formas EMSP y EMPR. Adaptada de Lublin FD *et al.*(15).

Considerando la gran heterogeneidad en el curso clínico y en la respuesta al tratamiento, se ha sugerido que cada una de las formas clínicas podrían producirse por mecanismos inmunopatológicos diferentes (16,17).

Recientemente ha surgido una nueva clasificación fenotípica en la que todas las formas progresivas son consideradas como una unidad, se elimina la forma progresiva-recurrente, y se incluye además el síndrome clínicamente aislado (CIS) como entidad clinicopatológica. A su vez, cada una de las formas clínicas se subdivide en formas activas y no activas desde el punto de vista inflamatorio (clínico o de neuroimagen). Aunque esta clasificación está cada vez más presente, todavía no existe una estandarización para su utilización en la práctica clínica habitual (18).

### 3.1. Escalas de discapacidad

El grado de discapacidad y disfunción neurológica de los pacientes se mide internacionalmente según la escala de discapacidad de Kurtzke o EDSS (*Expanded Standard Disability Status Scale*) (19), que se extiende desde el 0 (examen neurológico

normal) al 10 (muerte asociada a la enfermedad) (20) con intervalos de 0,5 puntos. Para su determinación se valoran las alteraciones en los sistemas funcionales (funciones piramidal, cerebelosa, del tronco cerebral, sensitiva, esfinteriana, visual, mental y otras funciones) tras la exploración neurológica. Esta escala es útil para el seguimiento del curso evolutivo de la enfermedad y por tanto utilizada en muchos estudios como criterio de respuesta al tratamiento. Una desventaja del uso de esta escala es que deja al margen algunos aspectos como la capacidad cognitiva, visión, fatiga, calidad de vida y el control de la función esfinteriana del paciente, y además, su evaluación incluye un sesgo por parte del observador. Más recientemente se ha descrito la escala MSSS (*Multiple Sclerosis Severity Scale*), que evalúa la discapacidad a través del EDSS teniendo en cuenta los años de evolución de la enfermedad (21), y que también se mide en una escala del 1 al 10 donde 10 representa un mayor disfunción adquirida en el menor tiempo.

## **4. Etiología de la EM**

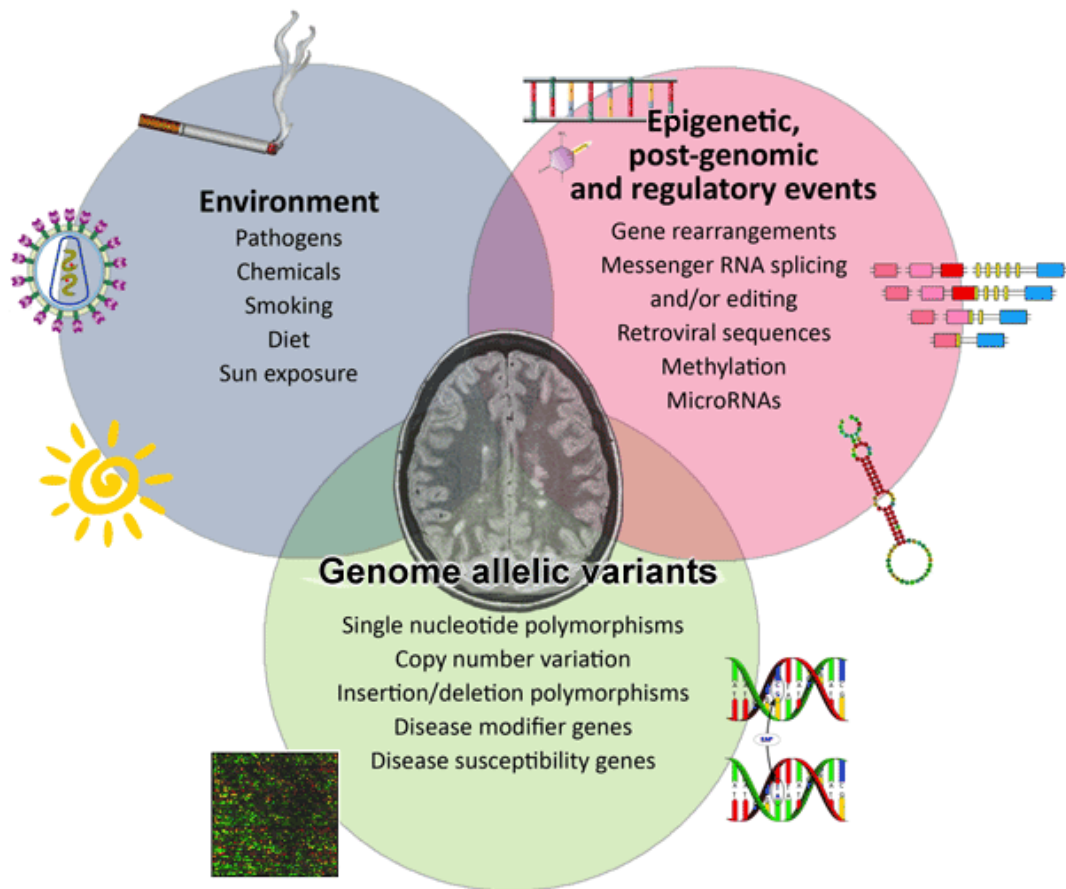
La EM es considerada una enfermedad compleja de etiología desconocida. Varios estudios epidemiológicos apuntan a que ciertos factores ambientales tienen un papel destacado en la susceptibilidad a padecer EM en individuos genéticamente predispuestos (22) (Figura 3).

### **4.1. Factores de riesgo ambientales**

#### **4.1.1. Distribución geográfica y vitamina D**

Varios estudios migratorios muestran la influencia de factores ambientales y el tiempo de exposición en el desarrollo de la EM. Además, la exposición a ciertos factores ambientales en edades tempranas (infancia y adolescencia) irían asociadas a un mayor riesgo de padecer la enfermedad (23). El gradiente latitudinal podría considerarse uno de los principales factores ambientales de susceptibilidad a padecer EM. En realidad, sería la correlación de la latitud con ciertos factores ambientales como la exposición a luz solar como fuente de vitamina D, la que explicaría estos efectos observados. Varios estudios muestran una asociación inversa entre los niveles de vitamina D en sangre de adultos jóvenes y el riesgo a desarrollar EM (24), con independencia de los niveles que presentasen durante su infancia (25). Además, la

exposición continuada al sol durante toda la vida parece tener un efecto protector sobre el desarrollo de CIS en un estudio realizado en Australia (26).



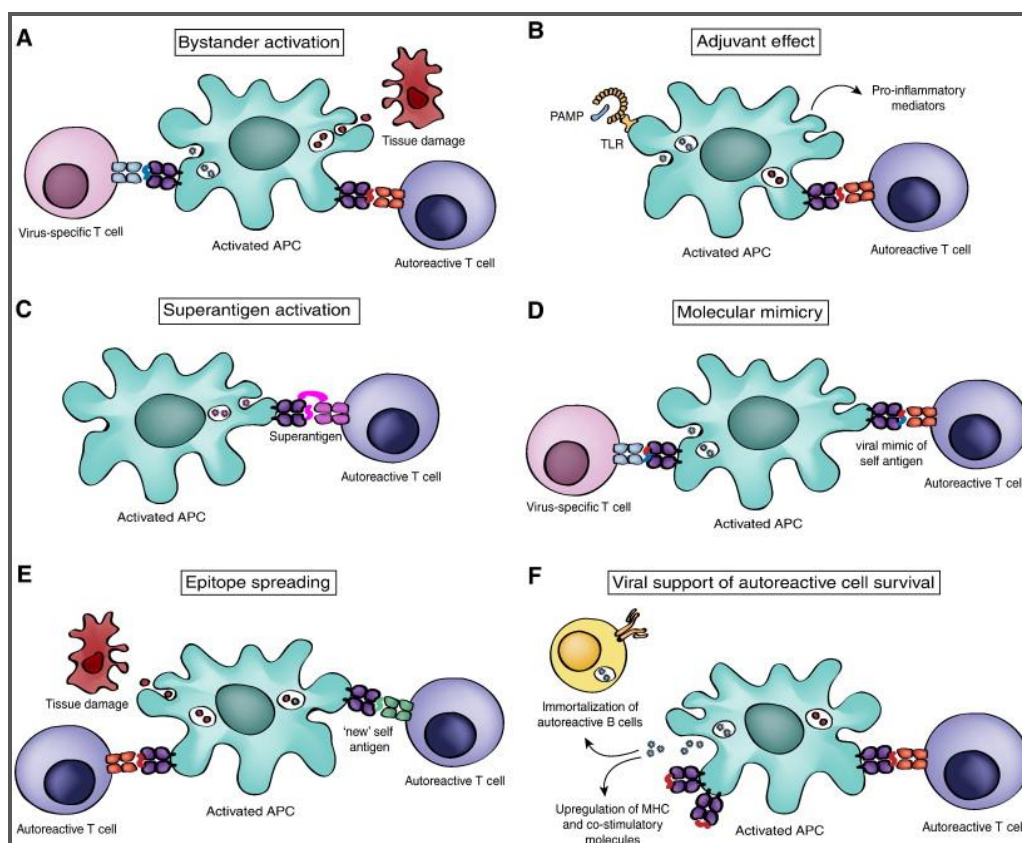
**Figura 3.** Factores de susceptibilidad en EM. Imagen extraída de (27).

#### 4.1.2. Infecciones por microorganismos patógenos

La posible relación entre ciertos agentes infecciosos y el desarrollo de EM fue descrita hace más de 100 años llegando incluso a plantearse la posibilidad de una vacuna para tratar la enfermedad (28). Son muchos factores los que apoyan esta teoría: 1) la presencia de material genético de varios microorganismos en lesiones de pacientes con EM, y la alta prevalencia de ciertas infecciones en estos individuos; 2) la existencia de modelos animales en los que puede inducirse la enfermedad con agentes virales (*Theiler's murine encephalomyelitis virus* (TMEV), o el virus de la hepatitis murina); 3) el 30% de los brotes de EM se preceden de cuadro infeccioso; 4) los estudios epidemiológicos indican que un factor de exposición en la infancia predispone al desarrollo de la enfermedad.



Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que llegarían a desencadenar una respuesta autoinmune, se postulan las siguientes teorías: A) células que mueren a causa de la infección liberan autoantígenos que son captados por las células presentadoras de antígeno (CPAs), y que los presentan a linfocitos T autorreactivos (activación “bystander”); B) la activación de la inmunidad innata tras la estimulación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) por agentes infecciosos, induce y potencia la expresión de mediadores inflamatorios y linfocitos autorreactivos; C) superantígenos microbianos inducen una activación inespecífica de linfocitos T autorreactivos; D) fenómenos de mimetismo molecular conducirían a la reactividad cruzada entre antígenos microbianos y secuencias homólogas dentro del SNC; E) el proceso de “extensión del epítipo” (*epitope spreading*) puede activar linfocitos T autorreactivos frente a nuevos autoantígenos potenciando la respuesta autoinmune; F) agentes infecciosos pueden potenciar la activación de CPAs e inducir la supervivencia de linfocitos autorreactivos (revisado en (29)) (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismos moleculares de autoinmunidad inducida por patógenos. Extraída de Kakalacheva *et al.* (29).

Entre los agentes infecciosos más relacionados con la EM destacan el virus Epstein-Barr (VEB), el herpesvirus humano tipo 6 (VHH-6) y el virus varicela-zoster (VVZ), todos ellos de la familia Herpesvirus. Estos virus con tropismo neural y linfoide, disponen de mecanismos para evadir la respuesta inmunológica y establecerse como infecciones latentes persistentes en el hospedador.

*Virus Epstein-Barr:* Aunque el 95% de la población humana es seropositiva para el VEB, algunos estudios han demostrado que existe una correlación entre el título de anticuerpos y el riesgo a desarrollar EM, el cual es prácticamente nulo en individuos seronegativos. Se trataría, por tanto, de una condición prevalente pero no suficiente. Se ha observado la presencia de anticuerpos anti-antígeno nuclear 1 (EBNA1) en pacientes hasta 5 años antes del diagnóstico de la enfermedad (30,31), y un aumento significativo de los niveles de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> específicos de EBNA-1 en pacientes con EM (32).

*Herpesvirus humano tipo 6:* Como en el caso anterior, el VHH-6 tiene una elevada prevalencia en la juventud y posteriormente permanece latente. Existen dos variantes moleculares, biológicas e inmunológicas del VHH-6 con diferente tropismo por células neurales. La variante A parece ser más neurotrópica, pero es la variante B la que se ha encontrado más frecuentemente en enfermos con EM (33–35). Se ha detectado la presencia de linfocitos T específicos del VHH-6 en lesiones (36,37). Dado que la mayoría de la población sana presenta anticuerpos para VHH-6, la mayoría de estudios en EM se han enfocado en estudiar la expresión de proteínas virales como indicadores de replicación activa viral. Se ha detectado ARN en sangre del 65% de pacientes con la forma clínica EMRR, y un aumento de la carga viral en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en este tipo de pacientes durante el brote clínico (38). Además, se ha observado un aumento del título de anticuerpos IgM e IgG anti-VHH-6 un mes y 15 días previos al brote respectivamente (39,40) que apoyan su implicación en la aparición del brote.

*Virus varicela-zoster:* Recientemente se ha observado un aumento de la carga viral de VVZ durante fases activas de la enfermedad y niveles indetectables en fase de remisión (41) al igual que ocurre, aunque en menor medida, en fases progresivas de la enfermedad (42).

*Otros microorganismos:* Se ha observado que la inmunización con *Streptococcus pneumoniae* se asocia a un empeoramiento de la enfermedad (43). Por el contrario, infecciones por helmintos se asocian a un curso clínico más leve debido probablemente a la promoción de respuesta Th2 y el incremento de células T reguladoras (T<sub>Reg</sub>) (44).

#### 4.1.3. Teoría de la higiene

Esta teoría propone una relación entre las infecciones y el desarrollo de procesos autoinmunes, de manera que la reducción en el número de infecciones durante la infancia debido a una higiene cada vez mayor, explicaría el reciente aumento en la incidencia de ciertos procesos autoinmunes y alergias en el adulto en las últimas décadas. Esta hipótesis sugiere que una infección subclínica adquirida por un individuo durante su infancia en un ambiente con altas condiciones higiénicas podría estar más predispuesto a desarrollar EM (45).

### 4.2. Factores de riesgo genéticos

La EM es considerada una enfermedad genéticamente compleja, que no sigue una herencia mendeliana, en la que numerosas variantes genéticas parecen estar influyendo en la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Hasta la fecha, el complejo HLA (sistema del antígeno leucocitario humano) es la región más fuertemente asociada a EM, aunque por sí solo no es capaz de representar todo el componente genético asociado a la enfermedad. Fuera de esta región se han identificado numerosos genes que también contribuyen al riesgo de desarrollar EM, aunque con un efecto menor, como son el receptor de la IL-7, IL-1ra o el receptor de la fracción constante de las Ig entre otros (46).

#### 4.2.1. Genes en la región HLA

La región del HLA se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y supone el determinante genético más fuerte en la susceptibilidad a EM. Se caracteriza por ser altamente polimórfica, tener una alta densidad génica y una baja tasa de recombinación (47). La participación de este complejo en la selección del repertorio de linfocitos T y en su capacidad para responder a antígenos específicos explica la importancia de esta región en el estudio de enfermedades inmunológicas. Alguna alteración en estos genes podría inducir la presentación de un péptido del SNC a linfocitos autorreactivos (no eliminados en la selección tímica) y, de esta manera, inducirse una respuesta

inflamatoria que produciría la desmielinización de los axones neuronales (48). La primera evidencia de asociación de esta región con la EM data de hace más de 30 años (49). Actualmente, el haplotipo DR15 (*DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602*) es el que confiere un mayor riesgo de EM. Este haplotipo es el más prevalente en las zonas geográficas denominadas de “alto riesgo” de EM (50). Sólo la presencia del alelo *DRB1\*1501* incrementa el riesgo de EM seis veces en homocigosis y tres en individuos heterocigotos. En la población sarda y otros grupos étnicos mediterráneos, existe una mayor asociación de EM con los haplotipos DR3 (*DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201*) y DR4 (*DRB1\*0405-DQA1\*0301-DQB1\*0302*) (51,52).

A pesar de su importante contribución a la susceptibilidad de la enfermedad, los polimorfismos en la región HLA no correlacionan con el curso y gravedad de la EM y no tienen por tanto valor pronóstico.

#### 4.2.2. Genes fuera de la región HLA

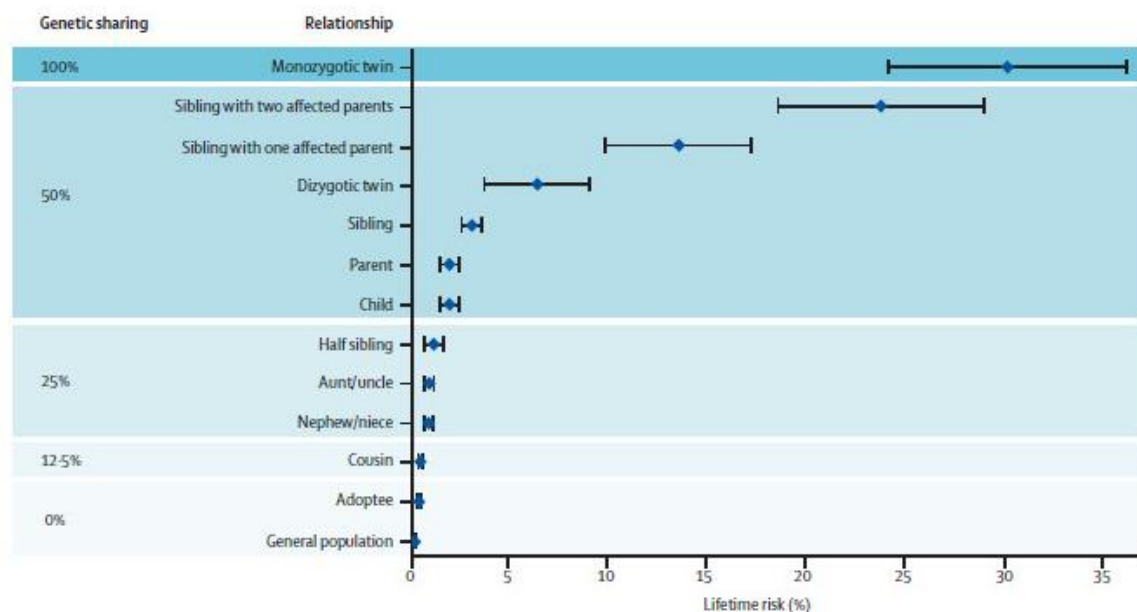
Se han realizado numerosos estudios en todo el genoma para detectar el posible papel de otras regiones cromosómicas no-HLA en la susceptibilidad a la EM. Los estudios de asociación de genes candidatos investigan genes cuyas funciones biológicas podrían desempeñar un papel en la fisiopatología de la EM, basándose en genes asociados a riesgo a padecer otras enfermedades de base inmunológica (53,54). Buscan identificar las variantes genéticas implicadas directa o indirectamente (en desequilibrio de ligamiento) con la enfermedad. Inicialmente, los marcadores genéticos más estudiados fueron los microsatélites (secuencias de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem un número variable de veces), pero en la actualidad lo más estudiado son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). En estos estudios se comparan las frecuencias alélicas y/o genotípicas entre enfermos con EM (casos) y sujetos sanos no emparentados genéticamente (controles) para detectar diferencias significativas entre los dos grupos e inferir una asociación con la enfermedad.

La revolución en este área llegó de la mano de los estudios de asociación mediante barrido genómico (GWAS), cuyo objetivo es analizar el genotipado de SNPs a gran escala cubriendo una gran variabilidad repartida por todo el genoma e identificar asociaciones genéticas con enfermedades o con rasgos fenotípicos sin una hipótesis previa (54). Estos estudios permiten analizar un gran número de genes e individuos a la vez, permitiendo detectar incluso aquellos alelos con un menor efecto, dada la fuerte potencia estadística de estos diseños. En total, se han realizado 14 GWAS hasta la fecha



### 4.3. EM familiar

El hecho de que el 20% de los pacientes tenga historia familiar de al menos un caso adicional de EM destaca la importancia de la genética en la susceptibilidad a la enfermedad. Existe una tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos del 31% frente al 5% en gemelos dicigóticos, y un riesgo de padecer la enfermedad entre hermanos no gemelos 30 veces aumentada respecto a individuos no emparentados y la mitad para medios hermanos (71,72). Además, varios estudios de agregación familiar muestran una disminución del riesgo a padecer la enfermedad según disminuye el grado de parentesco (73,74) (Figura 6). Aunque esta mayor incidencia en familiares podría deberse a factores ambientales y estilo de vida comunes, varios estudios demuestran la importancia genética en estos casos familiares. Por un lado, se ha observado que el riesgo a padecer la enfermedad es mayor si ambos progenitores están afectados que si lo está uno solo (75). Por otro lado, el desarrollo de EM en individuos que fueron adoptados a una edad temprana y en los que el riesgo de la familia adoptante no fue superior al de la población general (76), destaca la importancia de la carga genética del individuo, que tendría una mayor influencia que los factores ambientales.



**Figura 5.** Riesgo de recurrencia de esclerosis múltiple en familias. Riesgo de recurrencia ajustado a la edad, en función del grado de carga genética compartida entre individuos. Datos obtenidos de varios estudios familiares. Extraída de Compston *et al.* (77).

Los estudios de ligamiento en el genoma completo se utilizaron durante dos décadas para investigar la herencia en familias, e identificar las regiones del genoma que se

desvían de la segregación independiente y cosegregan con la enfermedad. Se realizaron más de 30 estudios en familias con EM (78–80) en los que se analizaron cientos de microsatélites altamente polimórficos con una distribución uniforme por el genoma. Los análisis independientes de los diferentes grupos étnicos así como los metaanálisis de los datos conjuntos mostraron resultados no concluyentes excepto para el alelo HLA-clase II, previamente identificado como factor de susceptibilidad (81,82). Posteriormente, se estudió la presencia de SNPs, más abundantes en el genoma que los microsatélites, pero tampoco en este caso se identificó ninguna región asociada a EM fuera de la región HLA (83).

#### 4.4. Genetic Risk Score

A pesar de haberse identificado más de 100 SNPs fuera de la región HLA asociados a un mayor riesgo a padecer EM, cada locus considerado individualmente aporta un riesgo extremadamente pequeño ( $OR < 1,32$ ) (84). En los últimos años y tras la revolución de los GWAS, se ha intentado evaluar el efecto aditivo o conjunto de varios de estos SNPs en el desarrollo de varias enfermedades multigénicas como la EM. Para ello, se ha creado el genetic risk score (GRS) (85). Muchos de estos estudios se han centrado en casos familiares, donde se ha visto una mayor asociación de este patrón de SNPs con el establecimiento de la enfermedad (86,87).

Existen dos maneras de calcular el GRS según se tenga o no en cuenta el riesgo individual de cada variante. Así, el unweighted GRS (uGRS) surge de la suma únicamente de los alelos de riesgo (0, 1 o 2) presentes en cada SNP estudiado. El weighted GRS (wGRS) tiene en cuenta además el *odds ratio* (OR) de cada alelo estudiado, y nace del sumatorio del número de alelos de riesgo en cada SNP multiplicado por el log natural de su OR (88). Son varios los estudios centrados en establecer un GRS y definir un valor umbral que sirva para la estimación del desarrollo de la enfermedad (89,90). Sin embargo, valores por encima de este umbral se ha visto que tienen un valor clínico limitado en EM (91).

El GRS podría utilizarse para correlacionar con ciertos parámetros clínicos y paraclínicos y aumentar su valor en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad e incluso facilitar el abordaje terapéutico de una manera más eficiente y personalizada (92).

## 5. Diagnóstico de esclerosis múltiple

Los criterios diagnósticos de la EM han ido variando considerablemente en el tiempo. Inicialmente, según los criterios de Poser, sólo se consideraban los hallazgos clínicos y la presencia de bandas oligoclonales (BOC) en el LCR de los pacientes, como criterios para establecer un diagnóstico de certeza, aunque no temprano, de la enfermedad. Posteriormente, McDonald y cols. propusieron incorporar a estos criterios los datos obtenidos mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (93), que permiten evaluar la diseminación de las lesiones en espacio y tiempo. Con estos nuevos criterios se definía la forma clínica EMPP. Recientemente, Polman ha publicado una revisión a los criterios de McDonald (94) en la que los hallazgos clínicos y de RMN son suficientes para establecer el diagnóstico de la EM. De esta forma, la determinación de BOC en LCR, previamente incluida dentro de los criterios diagnósticos, ya no se requiere y se utiliza sólo como complemento en el diagnóstico de la forma EMPP. En la Figura 7 se representan de forma resumida los criterios diagnósticos incluidos en esta última revisión.

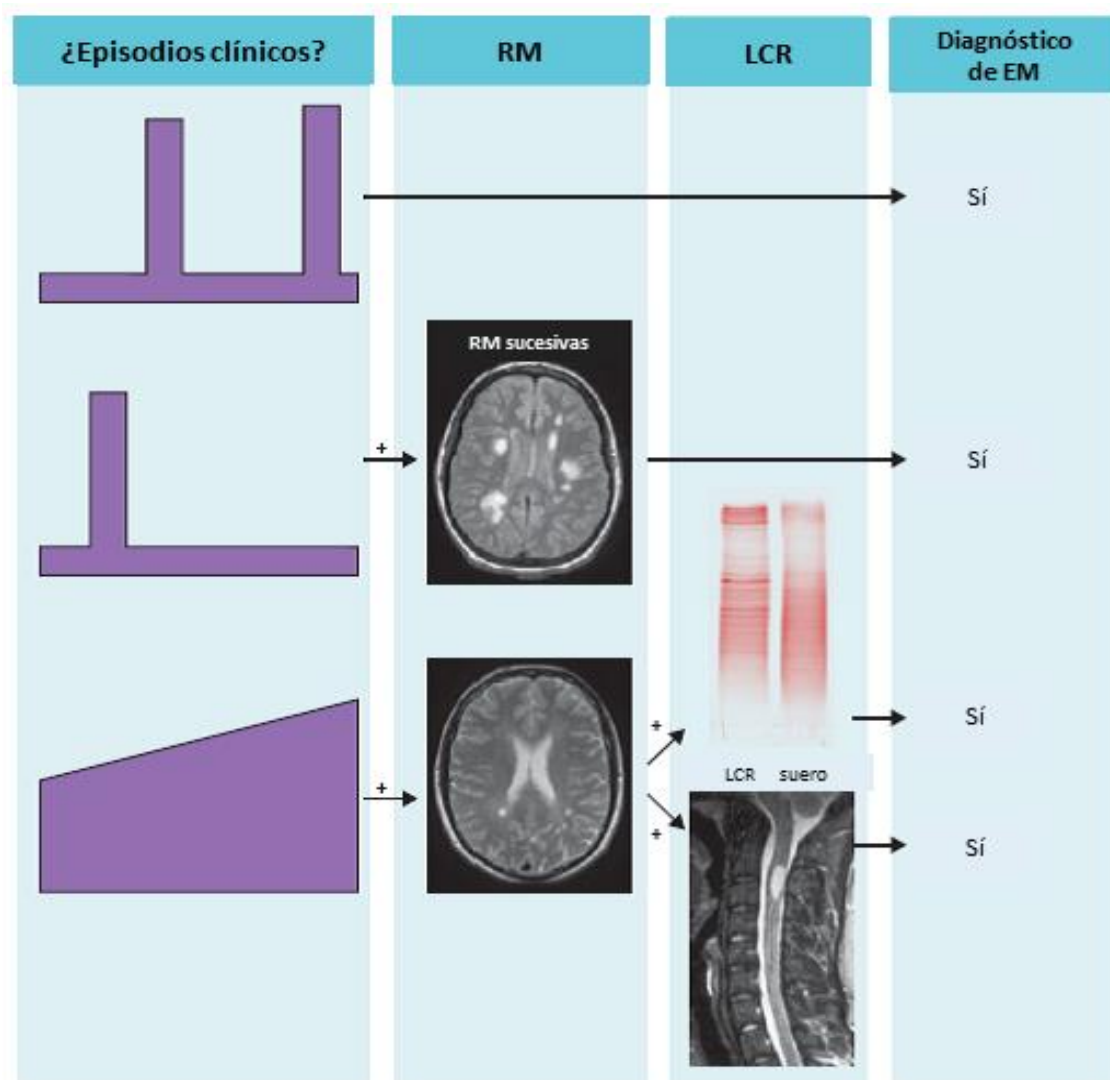
Lo más destacable es que, para la mayoría de casos, todavía es necesaria la aparición de un segundo brote o la observación de diseminación de lesiones en el tiempo para establecer el diagnóstico definitivo de EM, lo que sigue provocando un retraso en el diagnóstico de los pacientes y, por tanto, en su abordaje terapéutico.

### 5.1. Hallazgos clínicos:

La EM es una enfermedad clínicamente muy heterogénea debido a la multitud de procesos fisiopatológicos que intervienen. Existe un amplio repertorio de manifestaciones clínicas con implicación de los sistemas motor, sensorial, visual y autonómico tales como parálisis, pérdida sensorial, debilidad de las extremidades, fatiga, calambres, incontinencia y afectación cognitiva (70).

Aun así, puede decirse que existen dos síntomas clínicos característicos de EM: el signo de Lhermitte, caracterizado por una sensación breve de tipo descarga eléctrica que ocurre al flexionar o mover el cuello y que se irradia a lo largo de la columna, a menudo a las piernas, los brazos y ocasionalmente al torso; y el fenómeno de Uhthoff, alteración en la conducción nerviosa por una extremada sensibilidad al aumento de la temperatura corporal que suele traducirse en un empeoramiento temporal de la visión (77).





**Figura 7.** Criterios para el diagnóstico de EM. Revisión de Polman a los criterios McDonald de 2010. Figura extraída de Compston *et al.*(77).

## 5.2. Tests paraclínicos

Los tests paraclínicos proporcionan información útil para establecer un diagnóstico definitivo de EM. Estas pruebas incluidas en la revisión de Polman (94) son la RMN y el estudio de BOC en LCR.

### 5.2.1. Imágenes de resonancia magnética nuclear:

Las imágenes de RMN son útiles para visualizar las áreas de desmielinización en el SNC y establecer la diseminación de las lesiones en el espacio y en el tiempo (77). Para la detección de lesiones activas es necesaria la utilización de gadolinio, como medio de contraste que potencia la imagen de manera que las secuencias en T1 con gadolinio demuestran lesiones agudas con inflamación y ruptura de la BHE (92),

mientras que las secuencias en T2 muestran preferentemente lesiones crónicas. Para objetivar la diseminación en el tiempo se realizan exploraciones seriadas, a los 3 meses y en ocasiones a los 6 meses del brote inicial, a criterio del neurólogo. La actividad detectada por RMN antecede generalmente a los síntomas clínicos y es de 5 a 20 veces más frecuente que los brotes clínicos (95), permitiendo demostrar presencia de lesiones desmielinizantes no sospechadas clínicamente. La utilización de estas técnicas convencionales de imagen es esencial para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con EM. Sin embargo, no es útil por sí sola para establecer un diagnóstico de EM, ya que estas lesiones pueden aparecer también en otras enfermedades neurológicas (OEN). Además, estas técnicas no son útiles para determinar los mecanismos subyacentes responsables del daño del tejido cerebral y la discapacidad neurológica. Para esto han surgido nuevas técnicas de imagen capaces de monitorizar el daño axonal, la neurodegeneración, neuroinflamación y la reparación de mielina, y que por tanto permiten correlacionar con el grado de discapacidad o medir la respuesta al tratamiento. Estas técnicas incluyen la resonancia magnética con espectroscopia (ERM) y la tomografía por emisión de positrones (PET) (96,97).

#### 5.2.2. Análisis del LCR:

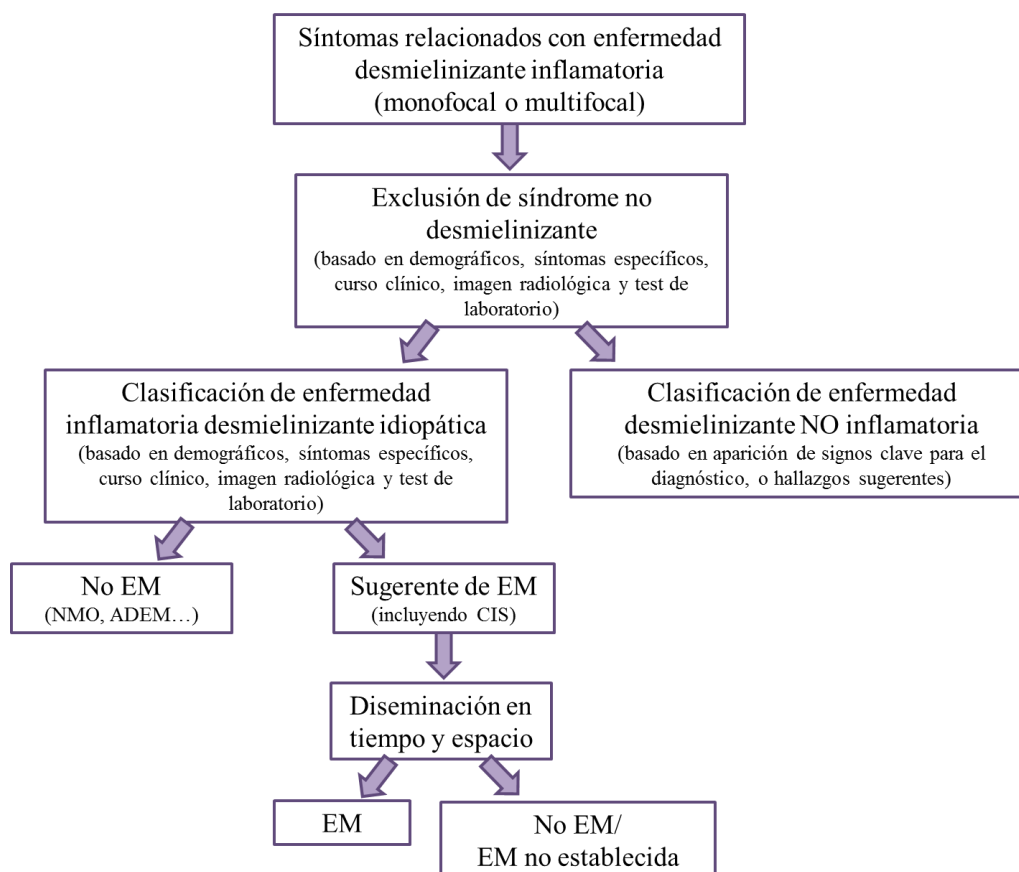
Las bandas oligoclonales IgG (BOC-IgG) en el LCR fueron el primer biomarcador descrito en pacientes con EM (98). Se encuentran en aproximadamente el 90% de los pacientes con EM y sugieren síntesis intratecal de inmunoglobulinas (99). Su detección no es específica de EM y su valor diagnóstico es útil cuando se han descartado previamente otras posibles causas de inflamación del SNC. Hoy en día sigue utilizándose como herramienta diagnóstica en la práctica clínica habitual, aunque relegada a pacientes con la forma clínica EMPP de acuerdo a la última revisión de Polman (94). Para su determinación es necesario realizar una punción lumbar. La presencia de dos o más BOC-IgG en LCR y ausencia en suero tiene un alto valor diagnóstico para EM (100).

Existen determinaciones adicionales a BOC en LCR como el índice IgG:  $[\text{IgG (LCR)} / \text{IgG (suero)}] / [\text{albúmina (LCR)} / \text{albúmina (suero)}]$ , que se encuentra incrementado en el 80% de pacientes y es indicativo de alteración en la permeabilidad de la BHE (101), y las BOC con IgM, con potencial valor pronóstico (102).

### 5.2.3. Diagnóstico diferencial

Es muy importante a la hora de diagnosticar EM excluir ciertas enfermedades con signos clínicos y paraclínicos similares. Este es el caso de pacientes con infecciones, enfermedades neoplásicas, congénitas, metabólicas o vasculares, o bien otro tipo de enfermedades inflamatorias desmielinizantes como la neuromielitis óptica (NMO) o la encefalomielitis diseminada aguda, que difieren de la EM en curso, fisiopatología, tratamiento y pronóstico.

No existe en la actualidad ninguna herramienta que facilite el diagnóstico diferencial de la EM. Miller y cols., propusieron un algoritmo que considera la forma de presentación clínica de la enfermedad y otros hallazgos paraclínicos (103). Según este modelo, la primera aproximación consiste en descartar enfermedades no desmielinizantes como infecciones o neoplasias, y en segundo lugar, diferenciar la EM de otros episodios desmielinizantes (Figura 8).



**Figura 8.** Algoritmo propuesto para el diagnóstico diferencial de la EM. Figura adaptada de (103).

## 6. Fisiopatología de la EM

Actualmente se desconocen los mecanismos exactos que conducen al desarrollo y establecimiento de la enfermedad. Se sabe que la EM es una enfermedad desmielinizante crónica del SNC en el que ocurren diversos procesos como la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), infiltración inflamatoria, destrucción de la vaina de mielina, pérdida de oligodendrocitos y fallos en los mecanismos de remielinización, que conducen a la pérdida axonal y neurodegeneración ulterior (104) (Figura 9). Aunque la inflamación parece estar presente en todo el proceso y existe una correlación entre el daño axonal y el grado de inflamación, hay otros importantes mecanismos implicados en este proceso, puesto que la pérdida axonal ocurre tanto en lesiones activas (inflamatorias) como inactivas. Existen actualmente cuatro teorías sobre los mecanismos que conducen a ello: 1) la inflamación es el evento patogénico exclusivo por el cual se desencadena todo el proceso posterior; 2) la neurodegeneración ocurre en primer lugar y la inflamación es una respuesta secundaria; 3) tanto inflamación como neurodegeneración contribuyen al curso clínico, pero como procesos independientes; 4) la inflamación promueve la neurodegeneración al dejar a los axones vulnerables (77).

Como se mencionó anteriormente, algunos autores han propuesto que las diferentes formas clínicas representan distintos fenómenos inmunopatogénicos subyacentes a la misma enfermedad con un resultado final común que es la acumulación de degeneración axonal. Mientras que la forma EMRR se caracteriza por ser fuertemente inflamatoria, la pérdida axonal independiente de inflamación es el principal determinante del daño irreversible característico de la fase progresiva (105). Hay estudios que indican que ciertos cambios metabólicos como la desfosforilación de neurofilamentos, estrés oxidativo y daño mitocondrial podrían conducir al daño axonal en las formas progresivas (106,107). Estas formas se caracterizan por la ausencia de lesiones activas, con cambios inflamatorios más heterogéneos y con una distribución anatómica y temporal más amplia que la forma EMRR.

### 6.1. El sistema inmunitario en la patología de la EM

Lo que parece evidente es que el sistema inmunitario desempeña un papel clave en todos estos procesos, como demuestran la presencia de células inflamatorias en las lesiones desmielinizantes, la susceptibilidad ligada a genes de la respuesta inmunológica, la modificación del curso de la enfermedad por el tratamiento

inmunomodulador, y la capacidad de inducir la enfermedad en modelos animales a través de la inyección de antígenos del SNC o de linfocitos T autorreactivos (108). Se ha considerado que la alteración en el balance entre respuesta efectora e inmunorregulación son los elementos clave que conducen al desarrollo de la EM (109). Parece claro que el sistema inmunitario innato tendría especial relevancia en el inicio y progresión, mientras que el adaptativo participaría en el mantenimiento y desarrollo de la enfermedad (110). Son muchos los procesos inmunopatológicos comunes a las distintas formas clínicas (111,112), resumidos en la Figura 7, aunque hay evidencias de que en la patología de las formas progresivas hay un predominio de respuesta inmune innata. La mayoría de los estudios sobre la patología de la EM se han centrado en la forma mayoritaria, EMRR, y por tanto en el estudio de lesiones activas (113). A continuación se detallan los procesos inmunopatológicos comunes que tienen lugar en la EM.

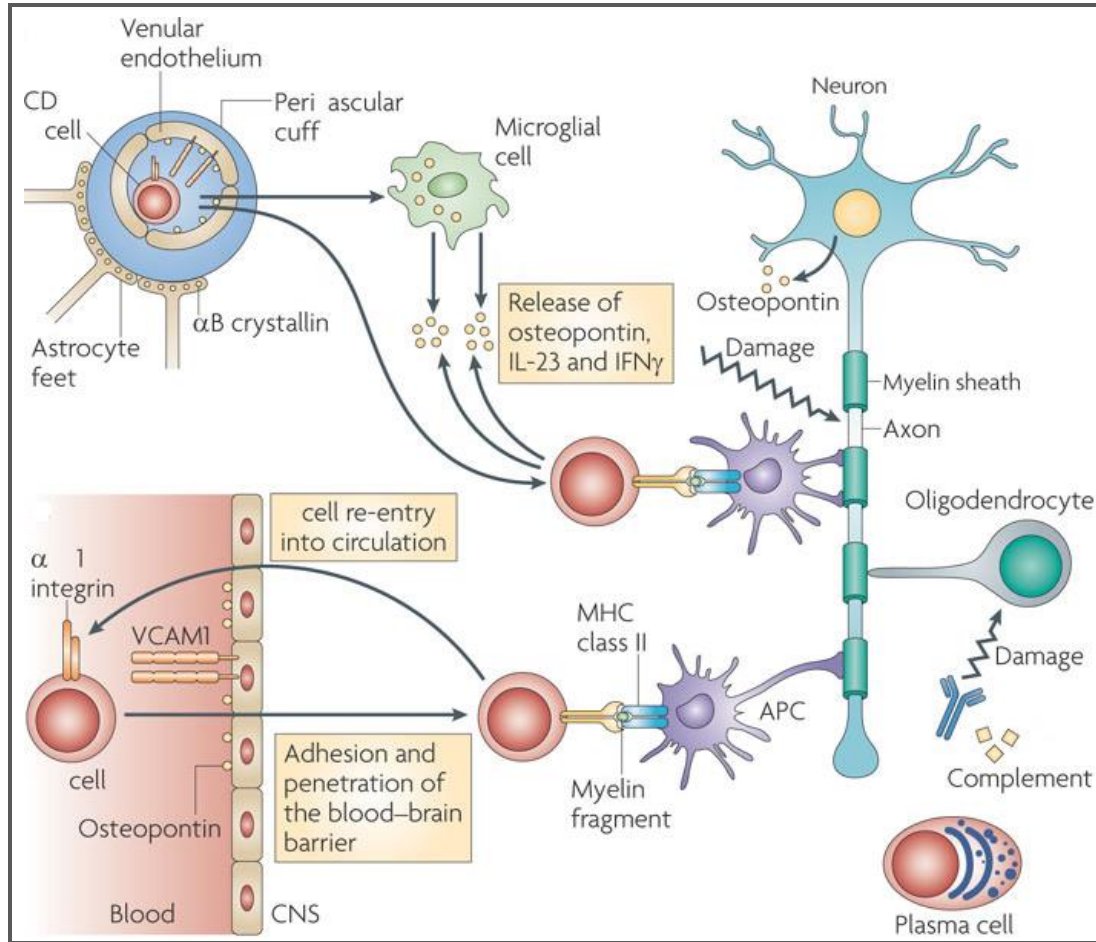
- **Generación de linfocitos autorreactivos**

Existen linfocitos T autorreactivos en circulación incluso en individuos sanos. Estos linfocitos escapan de los mecanismos de tolerancia central en el timo y son eliminados en su mayoría por mecanismos de anergia y supresión activa ejercida por los linfocitos T<sub>Reg</sub> (tolerancia periférica) (114). En EM, existe un incremento en la proporción y activación de estos linfocitos T autorreactivos. Existen discrepancias en cuanto a cómo y dónde ocurre esta activación. Por un lado, la activación podría ser periférica tras la presentación de algunos antígenos de mielina en los nódulos linfáticos cervicales a los linfocitos T (115). Por otro lado, existen teorías que apoyan la hipótesis viral y el mimetismo molecular como fuente de generación y activación de linfocitos T autorreactivos (116). En ambos casos, las CPAs juegan un papel importante perpetuando la presentación antigénica y el tráfico de linfocitos T al cerebro (117).

- **Entrada al SNC**

Tras ser activados, microglía, astrocitos y células endoteliales producen una alta cantidad de citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-6 y TNF- $\alpha$ , quimiocinas, moléculas de adhesión y metaloproteasas que favorecen la disrupción de la BHE y el reclutamiento de células al SNC. La microglia además aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y HLA-II amplificando y perpetuando así la respuesta inflamatoria y el daño tisular colateral (118). La activación de los linfocitos T

autorreactivos en la periferia produce un incremento en la expresión de la integrina  $\alpha 4 \beta 1$  (VLA-4), y un aumento en la expresión de receptores de quimiocinas, que favorecen su migración al interior del parénquima cerebral (119,120). Durante el brote además, se ha visto un aumento en la producción de metaloproteasas por neutrófilos, sobre todo la MMP-9, lo que favorece aún más la ruptura de la BHE (121).



**Figura 9.** Inmunopatogénesis de la EM. Figura extraída de Steinman *et al.* (122).

- **Lesión tisular y desmielinización**

#### Sistema inmunitario innato

Aunque las enfermedades autoinmunes se consideran por definición consecuencia de una respuesta anómala de la inmunidad adaptativa, existen cada vez más evidencias de que la inmunidad innata está implicada tanto en el inicio como en la progresión de la respuesta autorreactiva. Se ha postulado que un reconocimiento alterado por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en respuesta a ciertos estímulos exógenos o endógenos llevaría al aumento en la producción de ciertas citoquinas y quimiocinas proinflamatorias e inhibición de la síntesis de otras proteínas

como IFN tipo I, conduciendo a una inflamación desregulada y promoviendo así la respuesta autorreactiva y migración leucocitaria características de EM (revisado en (123)). En el siguiente apartado se hace una revisión más amplia de los hallazgos en este contexto descritos en la EM (señalización por PRRs y EM).

Las CPAs, además de iniciar y mantener la respuesta inflamatoria, desempeñan un papel importante en el proceso de desmielinización y lesión del tejido cerebral. Por un lado, se ha observado un incremento de células dendríticas (CDs) tanto en LCR como en sangre periférica en pacientes en brote (124), y una mayor producción de las quimiocinas CCL19 y CCL21 en lesiones (125). Por otro lado, los macrófagos que acceden al SNC, son capaces de disminuir o bloquear los potenciales de acción en el axón a través de la secreción de óxido nítrico (126).

Aunque a fecha de hoy se desconoce el papel exacto de otras células del sistema inmunitario innato en la EM, se han detectado abundantes CDs en lesiones cerebrales con fenotipo y/o función alterada (125). Su papel en EM no está del todo claro, y podrían actuar tanto promoviendo la respuesta T proinflamatoria a la mielina (127), como modulando la neuroinflamación estimulando la generación de LTreg (109). Existen mayoritariamente dos tipos de CDs: mieloides (CDm), las cuales producen importantes cantidades de IL-12p70 y generan una respuesta proinflamatoria y citotóxica; y plasmacitoides (CDp), que son tolerogénicas y producen IFN tipo I e inducen respuesta Th2 y Treg (128,129). CDp son la que principalmente infiltra el SNC en el modelo animal EAE (124). Mientras que las CDm se asocian con el inicio de la enfermedad, CDp se asocian con la inducción de Treg que frenaría la progresión de la enfermedad (130,131) y se han descrito varios defectos en la funcionalidad de esta subclase en pacientes con EM (132–134).

Por otro lado, aparecen niveles elevados de mastocitos en lesiones de EM, más frecuentemente en lesiones crónicas (135), y un incremento en la triptasa producida por mastocitos en LCR de pacientes con EM (136). También se ha observado un aumento en el número de neutrófilos, producción de gránulos de elastasa y catepsina-G y un incremento en la explosión oxidativa en pacientes con EMRR (137) que estaría directamente relacionados con el aumento de activación de linfocitos T y daño directo sobre el tejido (138,139).

Los linfocitos natural killer (NK) podrían desempeñar un papel doble en EM, favoreciendo por un lado el daño tisular a través de sus acciones citolíticas, producción

de citoquinas e interacción con CPAs, linfocitos T y B, y por otro regulando el exceso de respuesta inmunológica ya que, al bloquear su migración al SNC, existe una exacerbación de la enfermedad (140,141). Las células NKT se han asociado recientemente con la regulación de la respuesta inmunitaria en pacientes con EM, promoviendo la proliferación de linfocitos  $T_{Reg}$  y otras células mieloides inmunosupresoras, que favorecería además el establecimiento de una respuesta de tipo Th2. Además, el tratamiento con IFN- $\beta$  promueve el aumento en número y funcionalidad de estas células en pacientes en remisión (142,143).

### Linfocitos T $CD4^+$

Una vez han atravesado la BHE, los linfocitos T se reactivan gracias a las CPAs locales (CD, macrófagos, microglía) que presentan una fuerte capacidad presentadora por el aumento en la expresión de HLA-II. Esto conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  (Th1) e IL17 (Th17)), quimiocinas, y otras sustancias que promueven la supervivencia celular, el establecimiento de un ambiente proinflamatorio, y la aparición de una segunda ola de reclutamiento de células inmunes al SNC.

Hasta la década de los noventa, se pensaba que la respuesta de linfocitos T  $CD4^+$  de fenotipo Th1, caracterizada por la secreción de IL-12 e IFN- $\gamma$ , era la que principalmente mediaba la enfermedad. Posteriormente, con la identificación del subtipo de linfocitos T  $CD4^+$  Th17, productor de grandes cantidades de IL-17, se determinó que estas células eran capaces de inducir una EM más severa (142). Se ha descrito un aumento en la expresión de IL-17 en sangre, LCR y tejido cerebral en pacientes con EM (144), así como un aumento significativo de linfocitos T Th17 en LCR de pacientes con EM durante el brote. Ambos tipos celulares intervienen en la fisiopatología de la enfermedad (143).

Por otro lado, la alteración en los mecanismos reguladores por parte de linfocitos  $T_{Reg}$  pueden también ser muy importantes en el inicio y establecimiento de la enfermedad (145–147). En el modelo animal de EM de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la delección de  $T_{Reg}$  causa enfermedad autoinmune espontánea, y el incremento en proporción y funcionalidad se asocian a una incapacidad de desarrollar la enfermedad o a una mejoría clínica (148). Aunque en pacientes con EM no se han detectado cambios en la proporción de estos linfocitos  $T_{Reg}$ , sí se han detectado



problemas funcionales (149) que favorecerían el aumento en la respuesta efectora autorreactiva.

### Linfocitos T CD8<sup>+</sup>

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son células citotóxicas que desempeñan un papel patogénico directo, presentes en lesiones de pacientes con EM en mayor frecuencia que los CD4<sup>+</sup>, y altamente asociadas a la patogénesis tanto en el modelo animal EAE como en humanos (150). De hecho, el grado de lesión axonal es proporcional al número de macrófagos y linfocitos T CD8<sup>+</sup> presentes en las lesiones (151). Estos, reconocen moléculas de HLA-I de epítomos en la superficie de los axones de manera que producen el daño actuando directamente en el axón. Además puede inducir apoptosis de oligodendrocitos vía Fas-Fas ligando y promueven la permeabilidad vascular (152). Existen otras subpoblaciones de linfocitos T CD8 con funciones reguladoras y capaces de mediar la supresión de linfoproliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante la secreción de perforina (153) y promover los períodos de remisión.

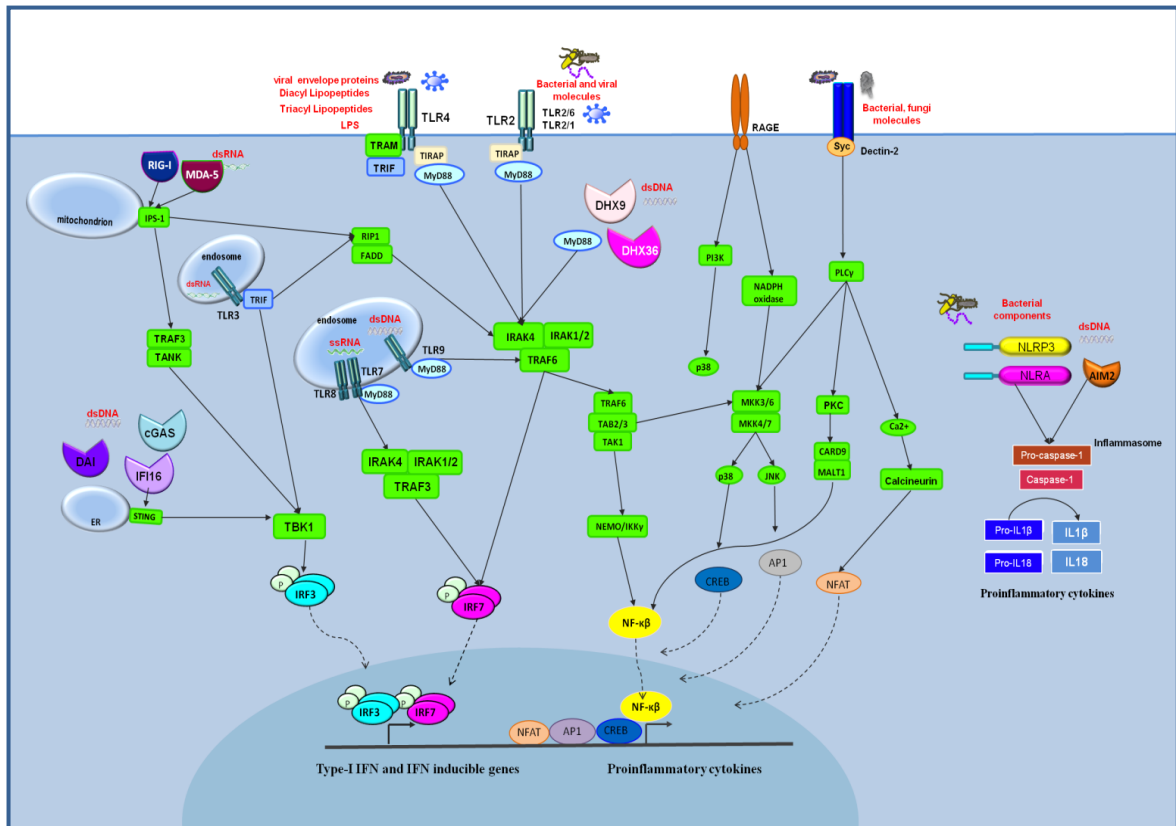
### Linfocitos B

Los linfocitos B tienen la capacidad de formar estructuras ganglionares ectópicas o centros germinales en las meninges de pacientes con EM donde son activados anormalmente y migran al SNC (154). El papel de estos linfocitos en la patogénesis se asocia principalmente a la producción intratecal de inmunoglobulinas, detectadas como BOC en la mayoría de pacientes con EM (155), las cuales reconocen componentes de la mielina, axones o neuronas contribuyendo a la desmielinización y daño axonal (156). También pueden funcionar como CPAs a linfocitos T específicos de mielina (157), o promover un ambiente regulador a través del reclutamiento de T<sub>Reg</sub> al SNC (158).

## **7. Señalización por PRRs y EM**

El sistema inmunitario dispone de receptores especializados (PRRs) en la detección de patógenos o ciertos procesos endógenos perjudiciales. Aunque estos receptores se expresan fundamentalmente en ciertas células del sistema inmunológico (células dendríticas, macrófagos y linfocitos activados), también se observan en otras células de naturaleza no inmunológica. El reconocimiento por PRRs activa rutas de señalización que conducen a la translocación al núcleo de factores de transcripción (NFκβ e IRFs)

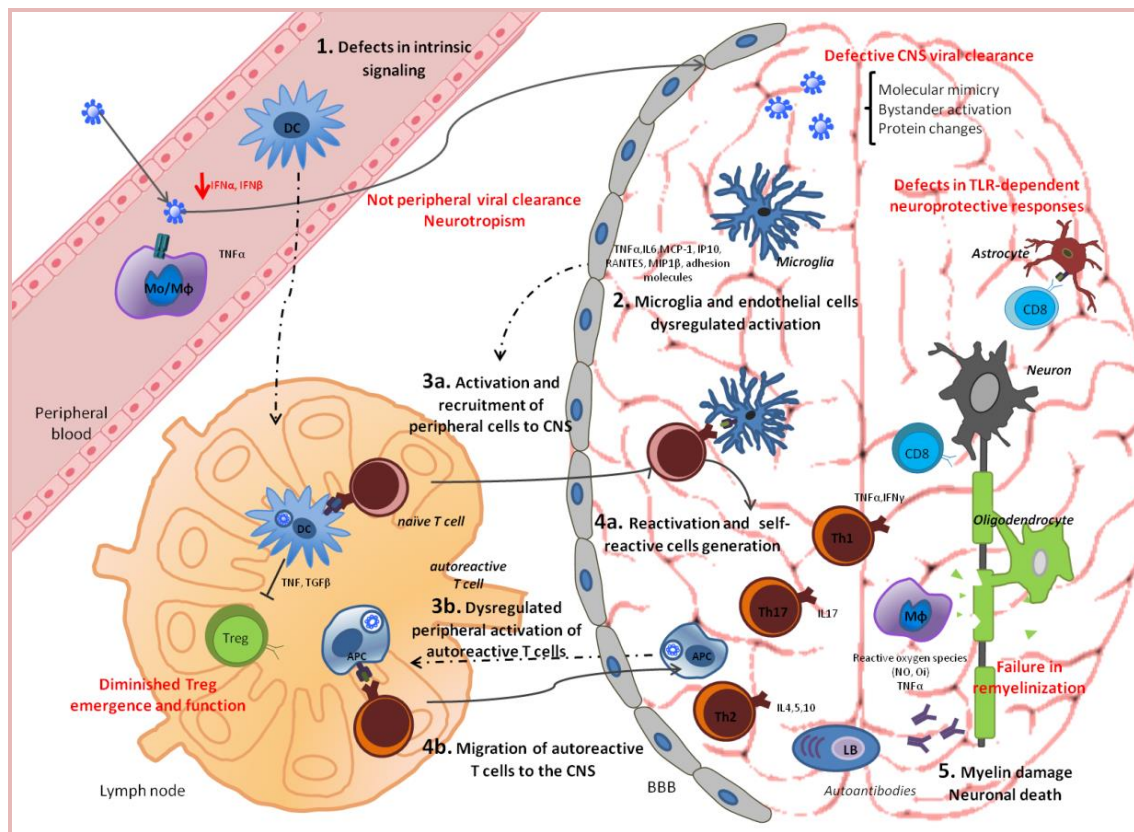
promoviendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, IFN-tipo I, receptores de quimiocinas o moléculas coestimuladoras (Figura 10).



**Figura 60.** Principales vías de señalización por PRRs relacionadas con EM. Extraída de Fernández-Paredes et al. (123).

Existen dos vías mayoritarias de señalización asociadas con los PRRs: una requiere la proteína adaptadora MyD88, que activa la producción de NF-κB y su traslocación al núcleo, induciendo la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-8, TNF-α e IL-12. La otra vía (MyD88-independiente), involucra el adaptador TRIF, y promueve tanto la producción de NFκB como la activación de IRF-3, induciendo la transcripción mayoritaria de IFN-tipo I. MyD88 puede asociarse también en algunos casos con IRF-7 e inducir la producción de IFN-tipo I. Aquellos PRRs encargados de reconocer antígenos extracelulares se asocian a una mayor producción de NF-κB, mientras que aquellos relacionados con el reconocimiento de antígenos intracelulares (TLR3, TLR7/8, TLR9, RIG-I, MDA-5), estimulan mayoritariamente la producción de IFN-tipo I, molécula con una potente actividad antiviral. Además, ciertos receptores tipo NOD promueven una respuesta proinflamatoria a través de la vía del inflamosoma, que estimula la producción de IL-1β e IL-18.

Existen cada vez más muestras de que un reconocimiento alterado por estos PRRs podrían tener un papel en la activación o silenciamiento de los linfocitos autorreactivos en enfermedades autoinmunes, incluyendo la EM (159). Este reconocimiento anómalo podría promover una síntesis aumentada de ciertas citoquinas y quimiocinas proinflamatorias o disminuir la producción de IFN tipo I, lo que conduciría a una inflamación descontrolada, aumento en la migración leucocitaria al SNC y de la respuesta inmunitaria autorreactiva (160–165). Una de las hipótesis más aceptadas es la participación de ciertos agentes virales como promotores de la enfermedad, sobre todo los de la familia de los herpesvirus. El reconocimiento de estos virus por parte de PRRs alterados, podrían ser la causa del inicio de una respuesta autorreactiva e inflamatoria descontrolada, característica de esta enfermedad (Figura 11).



**Figura 71.** Modelo hipotético de la inmunopatología de EM con virus como agentes causales. Extraído de Fernández-Paredes *et al.* (123).

Los PRRs que se han asociado en varios estudios con la aparición y progresión de la EM, son los que siguen a continuación:

### Receptores tipo Toll

En humanos se conocen al menos 11 tipos de TLRs (166). TLR1, 2, 4, 6 y 10 se localizan en la membrana celular y detectan primariamente moléculas de la superficie bacteriana desencadenando una respuesta proinflamatoria. TLR2 y 4 reconocen también antígenos de la superficie viral. Los TLR3, 7, 8 y 9 se localizan en endosomas, reconocen ácidos nucleicos específicos y participan por tanto en la respuesta frente a virus, con un aumento en la producción de IFN-tipo I (167). Las CDs son las que principalmente expresan estos receptores de respuesta antiviral. Existen dos poblaciones mayoritarias, las células dendríticas mieloides (CDm) que expresan TLR3, y las plasmacitoides (CDp) que expresan los TLR7 y 9 (168). Con la excepción de TLR5, 10 y 11, muchos estudios han demostrado la posible relación de la señalización por TLR y la patogénesis de la EM.

#### Receptores tipo RIG-I

Los receptores tipo RIG-I son una familia de receptores citosólicos que reconocen ARN extraño y propio. Esta familia incluye los receptores RIG-I, MDA5 y LGP-2. La señalización en los dos primeros conduce a una fuerte producción de IFN-tipo I, mientras que LGP-2 actúa como un regulador negativo (169). Ciertos problemas en la señalización por parte de estos receptores se han asociado con inflamación del SNC y el desarrollo de ciertos procesos autoinmunes. Además, varios estudios en ratones knockout (k/o) para RIG-I y MDA5 han mostrado susceptibilidad a ciertos virus capaces de inducir el modelo experimental de EM (170).

#### Receptores tipo NOD

Estos receptores son también receptores citosólicos que reconocen ciertos componentes bacterianos y señales de daño celular como los radicales reactivos de oxígeno, baja concentración de  $K^+$ , ultravioleta B (171). A día de hoy se han identificado 22 receptores de este tipo en humanos con dos cursos de acción diferentes. Algunos oligomerizan y forman inflamasomas, complejo multiproteico que induce la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  e IL-18, mientras que otros señalizan a través del factor nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) y ciertas proteinquinasas. Estudios de GWAS han identificado ciertos alelos en genes de NLRA y NLRP3, receptores que actúan a través de la vía del inflamasoma, fuertemente asociados a susceptibilidad a EM (172,173).

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los principales estudios que muestran asociación de estos receptores con EM, tanto en el modelo animal como en estudios *in vitro* e *in vivo* en humanos. El papel exacto de estos PRRs en EM se desconoce, sin embargo parece cada vez más aceptado que ciertos PRRs como TLR2 y el NLRP3, podrían estar relacionados con el establecimiento de la patogénesis de la EM, mientras que el TLR3 podría desempeñar un papel protector en la enfermedad. Un estudio en profundidad de estos receptores y su implicación en la patogénesis podría cambiar por completo el conocimiento sobre la enfermedad, así como puede proporcionar nuevas dianas terapéuticas.

PRR	Protección/daño	Modelo de estudio	Estudios en EAE/EM
TLR1/2	Daño	Humano	Función de TReg disminuida tras estimulación
TLR2	Daño	Ratón	Aumento de respuesta Th1/Th17 tras estimulación
			Ratones k/o muestran una respuesta Th17 disminuida
			Aumento de hialurónico (ligando de TLR2) lleva a fallos en remielinización
		Humano	Función de TReg disminuida tras estimulación
TLR3	Protección		Aumento de expresión en áreas de desmielinización
			Aumento de expresión en PBMCs y células de LCR
		Ratón	Bloqueo de desmielinización y supresión de EAE por IFN tipo I
		Humano	Ratones k/o TRIF- o IFNAR- tienen un incremento de respuesta Th17
TLR4	Protección		Neuroprotección (homeostasis)
			Producción de IFN- $\beta$ disminuida en PBMCs
		Ratón	CPA estimuladas con LPS muestran retraso en el desarrollo de EAE con disminución de HLA-II, CD83 y aumento de CD80/86 y citoquinas inmunoregulatoras
		Humano	Ratones k/o muestran un increment en respuesta Th17 y citoquinas proinflamatorias
	Daño		Aumento de TReg y BReg y migración al SNC tras estimulación
			Estimulación con PTX induce mayor reclutamiento de leucocitos al SNC
		Ratón	Ratones k/o en células CD4+ no muestran signos clínicos
			Ratones k/o en células $\gamma\delta$ T tienen una producción disminuida de IL-17 e IFN $\gamma$
TLR6/2	Daño		CDs estimuladas inducen conversion de células T vírgenes a efectoras
			Expresión aumentada de TLR4 y HMGB1 (ligando de TLR4) en LCR
		Humano	Promueve la regeneración axonal
			Estimulación de microglia y macrófagos con LPS incrementa citoquinas proinflamatorias y quimiocinas
TLR7	Daño	Ratón	Ratones k/o muestran una tasa de discapacidad similar a WT
TLR8	Protección	Humano	Expresión incrementada en fases tardías
TLR9	Protección		Expresión disminuida de TLR7 y Akt y disminución de la producción de IFN
		Ratón	Acumulación en axones
		Humano	Expresión disminuida con bajos niveles de citoquinas proinflamatorias
			Ratones k/o tienen aumentada la producción de IL-6 por esplenocitos
	Daño		Estimulación incrementaIDO (inmunorregulador). Ratones k/o en IDO muestran alta respuesta Th1/Th17 y reducidas TReg
			Ratones k/o tienen disminuida la severidad y cinética de EAE
		Humano	Disminuido en células B de memoria con alta producción de LF,TNF e IL12 y disminución en IL-10
		Ratón	Incrementado en fases tardías
		Humano	Suprime la function de TReg

PRR	Protección/daño	Modelo de estudio	Estudios en EAE/EM
RLH	Protección	Ratón	Ratones k/o en RLH, IPS-1, RLH desarrollan alta inflamación, daño neural y respuesta encefalitogénica Estimulación de RLH disminuye la respuesta Th1/Th17
NLRP3	Daño	Ratón	Incrementa el reclutamiento celular al SNC Ratones k/o muestran una disminución de la respuesta Th1/Th17
NLRA	Daño	Humano	Estudios de GWAS han identificado un alelo de susceptibilidad
IL1- $\alpha$	Daño	Humano	Incremento del ratio IL157/IL1R indica susceptibilidad y progresión
Caspasa-1 e IL-1R	Daño	Ratón	Promueve el desarrollo de EAE
Caspasa-1	Daño	Humano	Incremento en lesiones
Dectina-2	Protección	Humano	Estudios de GWAS muestran asociación con EM
MASP-3 y MBL	Protección	Humano	Expresión aumentada con baja actividad de la enfermedad
TREM-1	Daño	Humano	Expresión aumentada en macrófagos de lesiones activas
TREM-2	Protección	Ratón	Expresión incrementada en microglia y macrófagos del SNC con expression reducida de IL-6 y TNF43 y la microglia anti-inflamatoria
		Humano	Homeostasis neural Expresión disminuida en macrófagos

**Tabla 1.** Estudios de PRRs relacionados con la EM. Extraída de Fernández-Paredes *et al.* (123).

## 8. Biomarcadores en EM

En la actualidad no existen biomarcadores capaces de identificar a todo el conjunto de individuos afectados por la EM (174). Un biomarcador óptimo debe ser sensible, específico, reproducible, asequible económicamente y preferiblemente estable en el tiempo (175). En los últimos años, se han intentado identificar biomarcadores capaces de predecir el inicio de la enfermedad, reactivación o progresión y que puedan ayudar en el conocimiento de los procesos fisiopatológicos que tienen lugar.

### 8.1. Biomarcadores en fluidos biológicos:

Los fluidos corporales representan la mejor fuente de estudio en la búsqueda de biomarcadores debido a su accesibilidad, dinámica y bajo coste. Los fluidos más estudiados son el suero y el LCR. Las muestras de suero son las más fáciles de extraer aunque los niveles de biomarcadores pueden verse influenciados por las funciones hepática y renal e incluso por infecciones concomitantes o inflamación inespecífica. El estudio del LCR es de elección en el estudio de la fisiopatología de la enfermedad, puesto que refleja muchos de los procesos que están teniendo lugar localmente en el SNC y aporta marcadores específicos relacionados con la patología de la EM.

En la Tabla 2 se especifican los biomarcadores en suero y/o LCR validados en al menos dos estudios independientes, con poder diagnóstico, pronóstico y de respuesta al tratamiento.

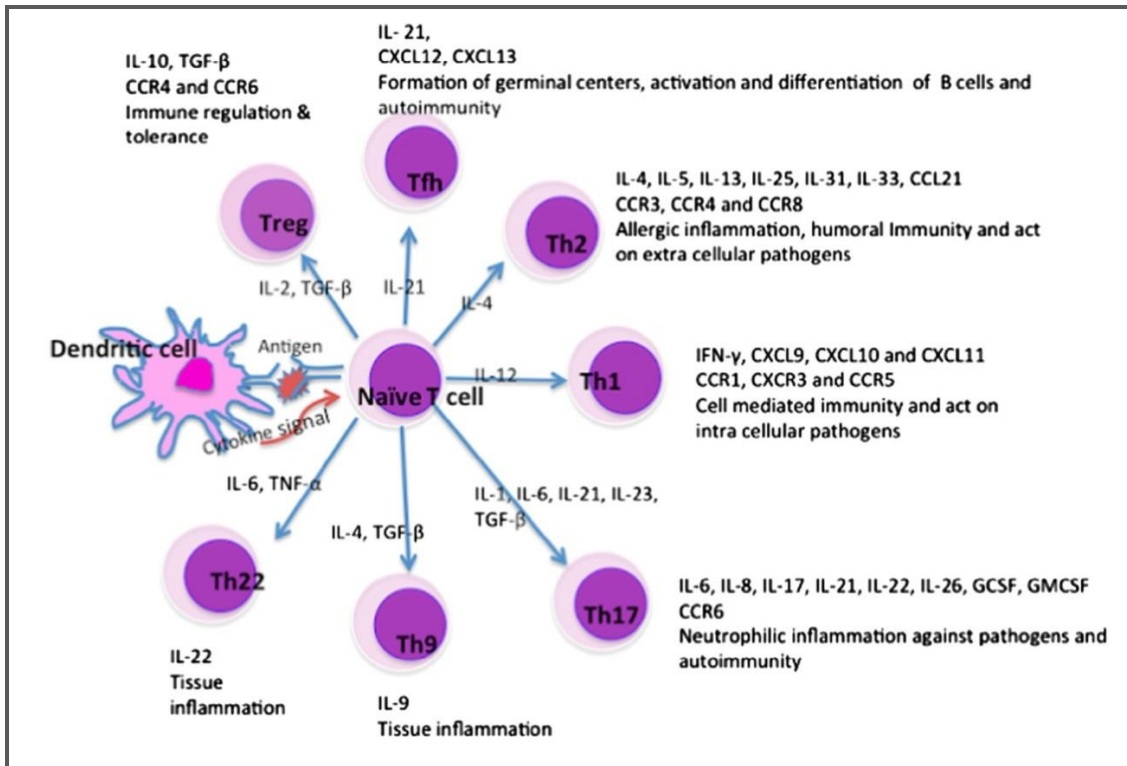
#### 8.1.1. Citoquinas y quimiocinas

En los últimos años se han incrementado el número de estudios que evalúan los niveles de citoquinas y quimiocinas en la EM debido a su importante papel regulando y promoviendo el ambiente inflamatorio (Figura 12), y en el reclutamiento de macrófagos, linfocitos T y otras células al interior del SNC (178–180). Sin embargo, la mayoría de estudios no han sido correctamente validados y muchos de ellos muestran resultados contradictorios.



Hallazgos en EM		Fuente
<b>Biomarcadores diagnósticos</b>		
BOC IgG	↑ (baja especificidad)	LCR
Índice IgG	↑ ratio (>0.7)	LCR/Suero
Anticuerpos anti-MBP-MOG	↑ en EM	Suero
Vitamina D	↓ en EM	Suero
Neurofilamentos (cadena ligera: NF-L)	↑ en EM	LCR
anti-aquaporina-4	Ausencia en EM, positivo en NMO (diagnóstico diferencial)	Suero
Ratio albúmina LCR/Suero	↑ en NMO (diagnóstico diferencial)	LCR/Suero
N-acetyloAspartato (NAA)	↑ en EM respecto a NMO (diagnóstico diferencial)	Suero/LCR
<b>Biomarcadores pronósticos</b>		
Anticuerpos anti-MBP-MOG	↑ en EM tras episodio de CIS	Suero
Chitinasa-3-like 1	↑ en EM tras episodio de CIS	LCR
Cadenas ligeras libres Kappa	↑ en EM tras episodio de CIS	LCR
BOC IgG	↑ en EM tras episodio de CIS. Correlación con curso más agresivo	LCR
Anticuerpos específicos IgG anti-MRZ	↑ en EM tras episodio de CIS (mayor especificidad que BOC IgG)	LCR
CXCL13	↑ en EM tras episodio de CIS, baja especificidad	LCR
Anticuerpos anti-Epstein-Barr	↑ en inicio temprano de EM	Suero y LCR
VEGF-A*	↓ mRNA en EM-SP comparado a EMRR	Monocitos
Especies reactivas de oxígeno (ON)	↑ correlaciona con progresión de la discapacidad	LCR
Neurofilamentos (cadena pesada)	↑ en formas progresivas	LCR
Tubulina/actina	↑ en formas progresivas	LCR
Proteína ácida Glial Fibrilar	↑ en EM-SP comparado a EMRR	LCR
Factor Neurotrópico derivado de cerebro (BDNF)	↓ en EM-SP comparado a EMRR	LCR
<b>Biomarcadores para diferenciar formas clínicas</b>		
miR-223, miR-23a, miR-15b	↓ en EM-PP	Suero
HGF, CCL11*	↑ en formas progresivas	Suero
EGF, CCL4*	↓ en formas progresivas	Suero
bFGF*	↓ en EM-PP	Suero
VEGF*	↑ en EM-SP	Suero
<b>Biomarcadores de respuesta al tratamiento</b>		
Anticuerpos anti-MBP-MOG	Respondedores a tratamientos frente a células B	Suero
Vitamina D	↑ en respondedores a IFN-β	Suero
Neurofilamentos (cadena ligera: NF-L)	↑ hasta niveles normales en respondedores a Natalizumab	LCR
Factor Neurotrópico derivado de cerebro	↑ en tratamiento con acetato de glatiramer	Cultivo
Acs neutralizantes contra IFN-β	Presencia en no respondedores a IFN-β	Suero
Acs neutralizantes contra Natalizumab	Presencia en no respondedores a Natalizumab	Suero
Acs anti-Varicella zoster	Riesgo de infección recurrente por VZ tras tratamiento con Fingolimod	Suero
Acs anti-JC virus	Riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva tras tratamiento con Natalizumab	Suero

**Tabla 2.** Biomarcadores en suero y/o LCR con poder diagnóstico, pronóstico, diferencial entre formas clínicas, y de respuesta al tratamiento. MRZ: measles, rubeolla, zoster (virus del sarampión, rubeola y varicela), Acs: anticuerpos. Revisado en (176,177).



**Figura 12.** Citoquinas, quimiocinas y receptores, células diana y mecanismos inflamatorios relacionados. Extraída de(181).

Se ha observado una correlación de los niveles de varias citoquinas tanto pro- como antiinflamatorias con cambios en la actividad de la enfermedad. La mayoría de estudios muestran un incremento de citoquinas y quimiocinas relacionadas con una respuesta de tipo Th1 (IP-10, TNF- $\alpha$ , IL-12p40, CXCL13, IL-8, CCL3, CCL4, CCL5) (182) o sus receptores (CXCR3, receptor de las  $\alpha$ -quimiocinas IP-10 y Mig, o CCR5, receptor de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES) (183–185), y disminución o ausencia de cambios en las relacionadas con respuesta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, MCP-1) (179). Una desregulación en el balance de estas proteínas podría conducir a la formación de lesiones inflamatorias agudas (186) (Tabla 3).

Destaca especialmente el estudio de quimiocinas como biomarcadores por la naturaleza organoespecífica de la EM y por tanto su implicación directa en el reclutamiento de células al interior del SNC. De todas ellas, las  $\alpha$ -quimiocinas Mig/CXCL9, e IP-10/CXCL10 han sido especialmente interesantes en este campo, por su relación directa con el IFN- $\gamma$ , el cual se ha visto incrementado en individuos con EM, y se ha detectado en numerosas lesiones. La mayoría de estudios muestran niveles elevados de ambas quimiocinas en suero o LCR de pacientes con EM, si bien la

mayoría de estudios utilizan individuos en brote o fase activa de la enfermedad (187,188). Lo mismo ocurre con la quimiocina RANTES/CCL5, que está elevada durante el brote (189). A su vez, la expresión de CXCR3 y CCR5, receptores de ambas  $\alpha$ -quimiocinas y RANTES respectivamente, se ha visto incrementada en células de sangre periférica de pacientes en brote y en pacientes con formas progresivas (190,191). Además, la frecuencia de células  $CD8^+CXCR3^+$  correlaciona con la actividad inflamatoria y destrucción tisular medida por RMN (188). Sin embargo, existen casos de disminución en la concentración de ciertas quimiocinas, como es el caso de MCP-1/CCL2 durante el brote (187,189).

Existen también estudios que muestran un poder pronóstico y de respuesta al tratamiento. El aumento de Fas y MIF se asocia a un empeoramiento neurológico asociado a una neurodegeneración progresiva, y TNF- $\alpha$  y MCP-1/CCL2 podrían ser útiles para diferenciar aquellos pacientes con la forma clínica EMPP (192). Una disminución de los niveles de IL-10 en suero o ARNm de IL-12p35 sirven para evaluar la respuesta al tratamiento con IFN- $\beta$  (193,194).

Perfil inmunol	Citoquinas y Quimiocinas	Receptor	LC R	Suero	Expresión en lesiones cerebrales
Th1	IFN- $\gamma$	IFNGR	↑/-	↑	Astroцитos y microglia en placas activas y crónicas
	TNF- $\alpha$	TNFR	↑/-	↑	Astroцитos y microglia en placas activas y crónicas
	IL-12	IL-12R	↑	↑	Infiltrados perivasculares de lesiones activas
	<b>CXCL9/MIG</b>	CXCR3	↑		Astroцитos en placas de desmielinización activa
	<b>CXCL10/IP-10</b>	CXCR3	↑	↑/-	Astroцитos en placas de desmielinización activa
Th2	CCL17/TARC	CCR4	↑	↓	
	CCL21/SLC	CCR7	↑		
Th17	CXCL8/IL-8	CXCR1/2	↑	↑	Astroцитos alrededor de lesiones activas
	IL-17	IL-17R	↑	↑	Astroцитos y oligodendrocitos de lesiones activas
	IL-23	IL-23R	↑	↑	Microglia en placas activas y crónicas
LB	CXCL12/SDF-1	CXCR4	↑		Astroцитos y vasos en lesiones activas y crónicas
	CXCL13/BCA-1	CXCR5	↑		Infiltrados perivasculares en placas
	CCL19/ELC	CCR7	↑		
T <sub>Reg</sub>	IL-10	IL10R	↑/-	↑	Aumento en márgenes de la lesión
	TGF- $\beta$	TGFBR	↓		Infiltrados perivasculares en placas
Amplio espectro	IL-12p40	IL-12R	↑	↑	Infiltrados perivasculares de lesiones activas
	<b>CCL2/MCP-1</b>	CCR1/2	↓	↓	Astroцитos y macrófagos en lesiones
	CCL3/MIP-1 $\alpha$	CCR1/5	↑		Macrófagos y microglia en placas
	<b>CCL4/MIP1-<math>\beta</math></b>	CCR5	↑		Macrófagos y microglia en placas
	<b>CCL5/RANTES</b>	CCR1/3/5	↑	↑	Macrófagos y microglia en placas

**Tabla 3.** Niveles de citoquinas y quimiocinas en suero y LCR de pacientes con EM. Se han resaltado algunos de los marcadores incluidos en este trabajo. LB: linfocitos B. Extraído de Kothur y Szczucinski (181,184).

### 8.1.2. Factores de crecimiento

Aunque menos estudiados en la EM, sus funciones en el crecimiento tisular, la remodelación y reparación y, por tanto, su relación con procesos como la degeneración axonal, gliosis, remielinización y vascularización hacen interesante su estudio en EM. Al igual que para la mayoría de citoquinas y quimiocinas, muchos de estos estudios no han sido validados y muestran resultados contradictorios.

Como se observa en la Tabla 1, el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A), con funciones importantes como la estimulación de división endotelial, formación ósea, hematopoyesis, y desarrollo neural (185,195–197), es un biomarcador validado para el diagnóstico de la enfermedad puesto que se encuentra disminuido en todas las formas clínicas. Sería también útil como marcador de progresión de EMRR a EMSP donde sus niveles son todavía menores (198).

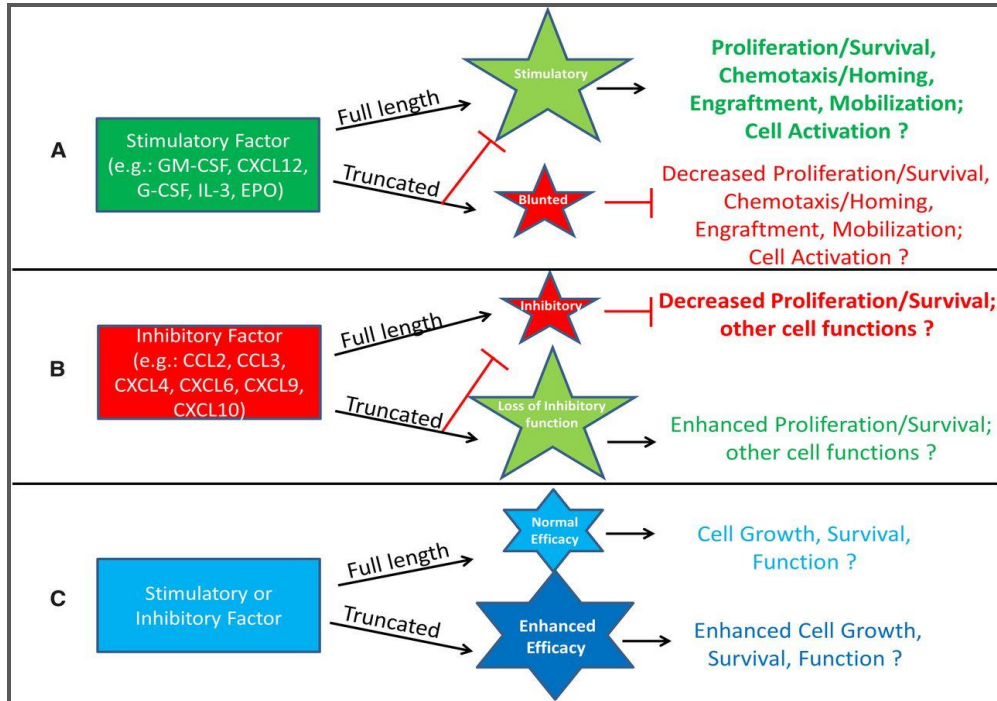
Por otro lado, aunque no validados, existen otros factores de crecimiento de interés en el estudio de EM. bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), que actúa como regulador del crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia de progenitores gliales del SNC (199), se ha visto aumentado en lesiones activas de EM (200), aunque su papel no está del todo claro en la enfermedad. Se ha asociado tanto a inhibición de la remielinización por parte de oligodendrocitos (201–203), como a un papel neuroprotector en el modelo animal (204). También existen estudios que muestran una disminución de EGF (factor de crecimiento epidérmico), factor que actúa favoreciendo la diferenciación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (199), en EM respecto a otras enfermedades neurológicas (205). Su administración en el modelo animal de EM mejora la sintomatología y supervivencia (206). Por último, el papel del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), relacionado con el desarrollo cerebral, con importantes funciones neurotrópicas (207,208), y que participa en la adhesión de LB, migración de linfocitos LT y reclutamiento de CDs (209–212), no está del todo claro en EM, mostrando resultados contradictorios (213,214).

#### 8.1.3. Dipeptidilpeptidasa 4

La dipeptidilpeptidasa 4 (DPP4 o CD26), es una serín proteasa con múltiples funciones según el tipo celular en que se expresa y las condiciones locales, y con un posible papel inmunoregulador en patologías autoinmunes (215). Esta enzima puede encontrarse como un dímero en la superficie de células epiteliales de hígado, riñón, intestino, células endoteliales, fibroblastos y linfocitos, así como en forma soluble en suero, plasma, líquido seminal e incluso en LCR en bajas cantidades (216,217).

Por su actividad serín proteasa, esta enzima elimina dipéptidos en la región N-terminal de varias proteínas que presentan los aminoácidos prolina o alanina en la penúltima posición (218). Entre los sustratos más importantes desde el punto de vista biológico destacan varias quimiocinas, hormonas gastrointestinales y neuropéptidos.

Las quimiocinas incluyen entre otras: MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, eotaxina/CCL11, MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 and SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 (revisado en (216,219)). El resultado de esta modificación puede tener múltiples efectos, tanto en la unión al receptor como en la señalización y por tanto en su actividad biológica (Figura 13). La modificación post-transcripcional de quimiocinas es por tanto un mecanismo de regulación esencial para potenciar o silenciar la respuesta inflamatoria (220).

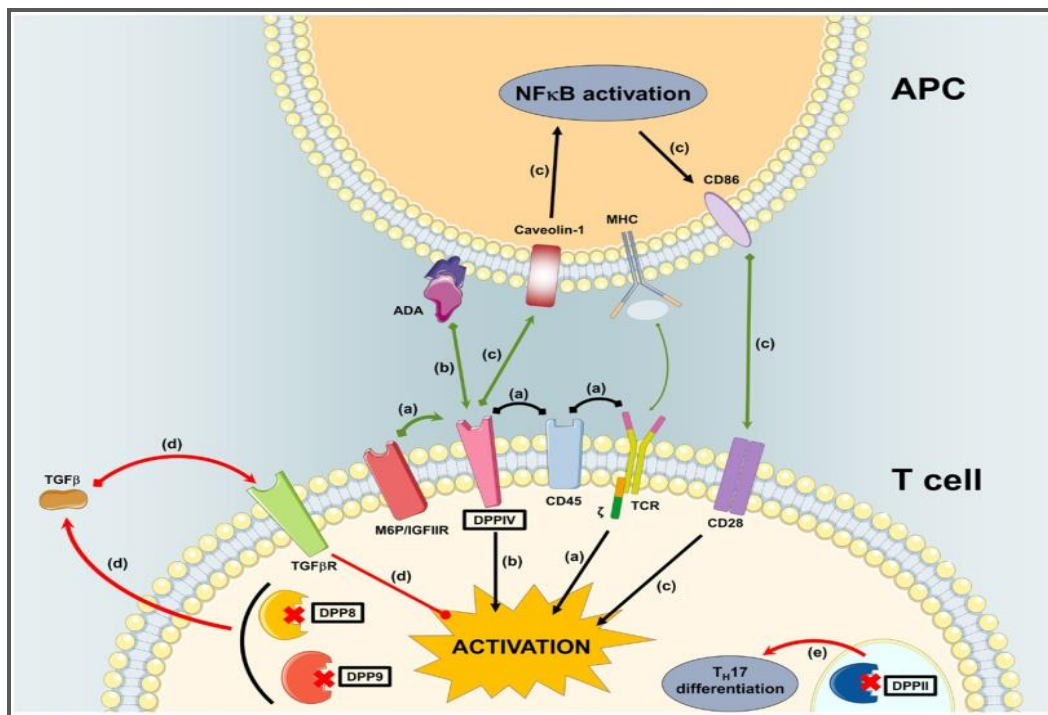


**Figura 13.** Efectos de la modificación de proteínas por la enzima DPP4. Extraído de De Meester et al. (221).

Recientemente, se ha descrito un papel importante de la actividad DPP4 sobre la quimiocina IP-10, con conocida función antiviral, en ciertos procesos en los que destaca una fuerte respuesta inflamatoria. La actuación de la enzima sobre IP-10 genera una isoforma de la quimiocina con función antagonista. En casos de inflamación por infección con el virus de la hepatitis C, se ha observado que concentraciones elevadas de la forma antagonista o truncada de IP-10, se asocian a una peor respuesta al tratamiento en pacientes crónicos. El aumento de esta forma antagonista reduciría la respuesta antiviral tanto innata como adaptativa, favoreciendo la cronicidad de la infección viral (222). En EM, se han detectado niveles aumentados de la forma soluble

de DPP4 (sDPP4) en LCR de pacientes en comparación con pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias (223).

A nivel celular, la enzima participa en la regulación y migración de linfocitos T y timocitos (224,225) y su expresión a este nivel se ha visto aumentada en ambientes inflamatorios (217). Linfocitos T con alta expresión de DPP4 en su superficie (DPP4<sup>hi</sup>) muestran un fenotipo efector (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>low</sup>) (226,227) e inducen una respuesta Th1 y Th17, con aumento en la síntesis de citoquinas proinflamatorias (228) (Figura 14). Los linfocitos Th17 en sitios de inflamación son los que mayor expresión de DPP4 muestran en su superficie (229). Debido a la importancia de la DPP4 sobre ciertos procesos fisiológicos y patológicos, la aplicación de inhibidores de esta enzima está siendo altamente investigada.



**Figura 14.** Efectos celulares de las enzimas de la familia DPP. Extraído de Waumans et al.(230).

Estudios sobre DPP4 en EM muestran resultados no concluyentes (231,232). Destacarían el aumento de células CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>DPP4<sup>hi</sup> de memoria que correlacionan con la severidad clínica de la enfermedad (227), o el aumento en linfocitos T DPP4<sup>+</sup> que correlacionan con la actividad clínica y por neuroimagen (233–235), y que se han visto aumentados en sangre y LCR de pacientes con formas progresivas de la enfermedad (236). Además, se ha observado que el tratamiento con IFN-β disminuye la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>DPP4<sup>+</sup> (237), y reduce la expresión

de la integrina CD49d, necesaria para la extravasación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>DPP4<sup>hi</sup> (238).

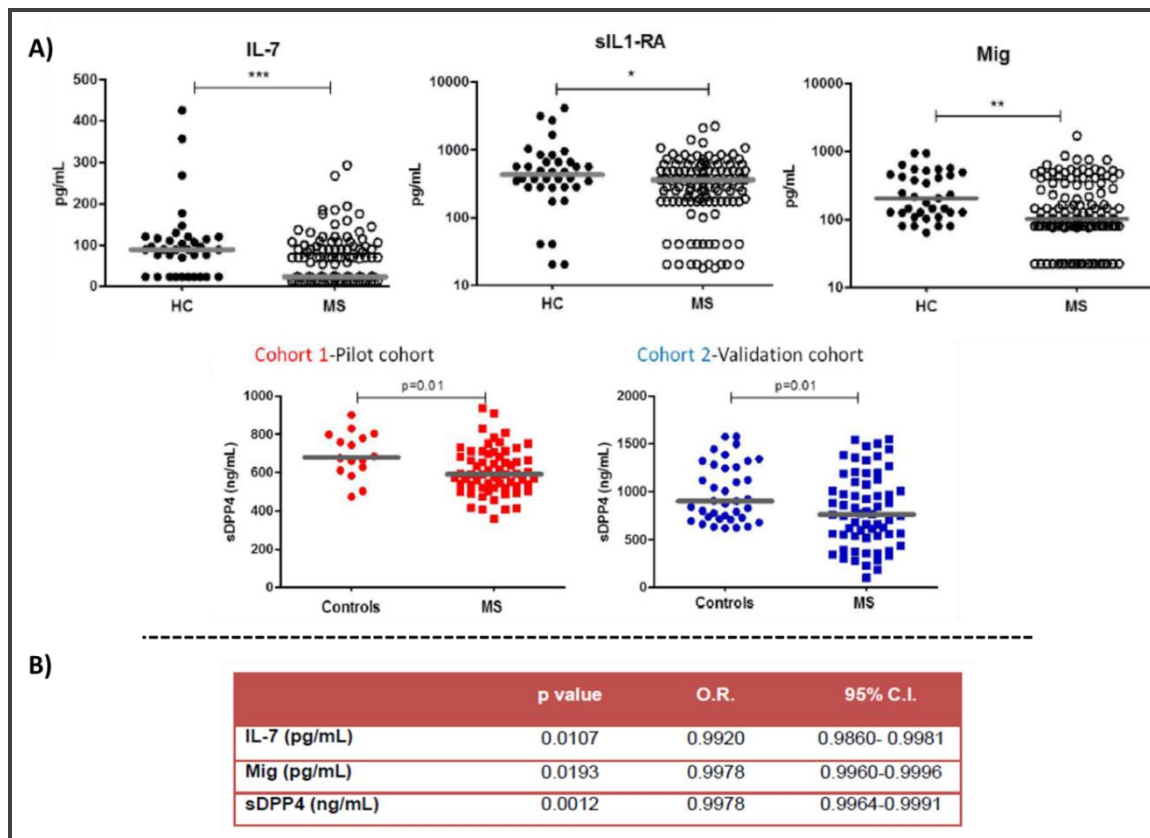
## **8.2. Identificación de biomarcadores diagnósticos y pronósticos en un estudio transversal. Resultados previos del grupo de investigación.**

Entre los años 2011 y 2013, nuestro grupo llevó a cabo un estudio observacional y transversal en el que se estudiaron los niveles en plasma de 30 analitos relacionadas con la fisiopatología de la EM en pacientes con EM y controles sanos (CS) (174). Entre los analitos estudiados se incluyen citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, IP-10/CXCL10, Mig/CXCL9, eotaxina/CCL11, RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8), y factores angiogénicos (VEGF, G-CSF, GM-CSF, EGF, bFGF y HGF). Paralelamente se estudiaron la actividad y niveles de la enzima DPP4 (soluble y unida a membrana) (239) en 2 cohortes de pacientes y controles independientes.

En este estudio se incluyeron un total de 129 pacientes con EM y 53 CS. Los pacientes se dividieron en 7 grupos clínicos que incluían: pacientes con EMRR en remisión, con enfermedad activa, en brote, en tratamiento con IFN- $\beta$  durante al menos 6 meses definidos como respondedores, no respondedores a tratamiento con IFN- $\beta$ , pacientes con la forma clínica EMSP, y pacientes con EMPP. Este estudio se centró en dos aspectos fundamentales: estudio de marcadores que discriminan la enfermedad respecto a CS; estudio de marcadores diferencialmente expresados en cada una de las formas clínicas, que diferencian procesos de inflamación y neurodegeneración.

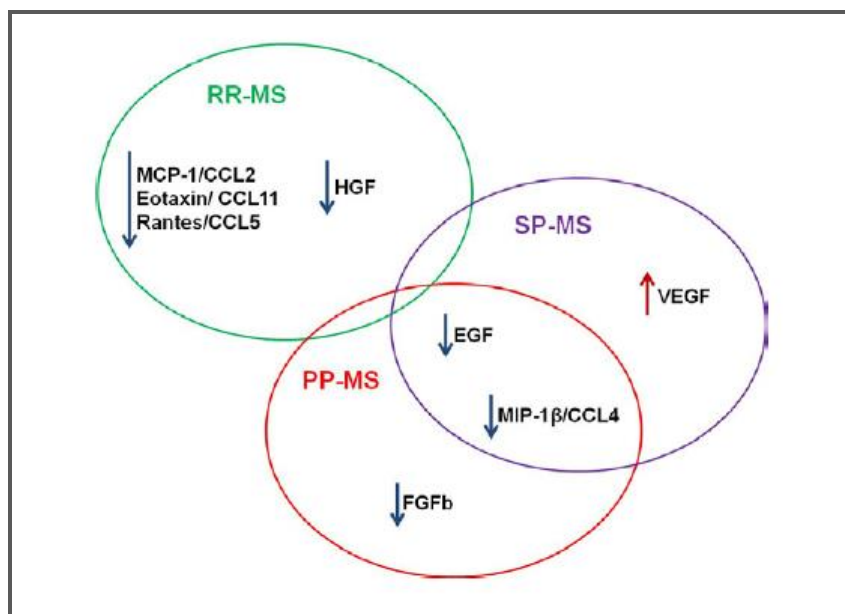
En primer lugar, se observó que los niveles de IL-7, IL-1Ra, Mig y sDPP-4 se encuentran disminuidos en el plasma de pacientes con EM. El análisis conjunto de DPP4, IL-7 y Mig por regresión logística permite la discriminación de pacientes con EM con una precisión del 79,7%. Estos analitos representarían factores de protección para la enfermedad, de manera que a mayores niveles, menor probabilidad de padecer EM. Este modelo presenta una sensibilidad del 96,5%, especificidad del 23,5%, valor predictivo positivo (VPP) del 80,9% y valor predictivo negativo (VPN) del 66,7% (Figura 15).





**Figura 15.** A) Representación de los niveles de IL-7, IL-1Ra y Mig (arriba) y de sDPP4 en cada una de las dos cohortes independientes (abajo) en CS y pacientes con EM. B) Modelo de regresión logística para el diagnóstico de EM (O.R. >/< mayor/menor probabilidad de EM) (240).

Por otro lado, se detectaron un conjunto de biomarcadores capaces de clasificar las distintas formas clínicas de la EM con una alta especificidad. La determinación de los niveles plasmáticos de HGF, eotaxina, EGF and MIP-1 $\beta$  y su análisis combinado, podría servir como una herramienta mínimamente invasiva, sencilla y efectiva para subclasificar a pacientes con EM. El análisis multivariante por regresión logística muestra una sensibilidad y especificidad mayores que las que aporta su análisis independiente, y se propone como una herramienta de utilidad para la práctica clínica. Este modelo presenta una sensibilidad del 71,7%, especificidad del 89,9%, VPP del 82,5%, VPN del 82,7% y una precisión del 82,6%. El análisis independiente muestra que HGF y eotaxina podrían considerarse factores de riesgo a desarrollar una forma progresiva de EM, mientras que EGF y MIP-1 $\beta$  serían factores de protección a la progresión. Por otro lado, y analizados independientemente, bFGF y VEGF muestran una disminución en la forma EMPP y un aumento en EMSP respectivamente (174). En la Figura 16 se muestra un esquema de los niveles de estos analitos en las diferentes formas clínicas de la enfermedad.



**Figura 16.** Representación de los niveles plasmáticos de cada uno de los biomarcadores con cambios significativos entre los grupos clínicos de EM (174).

En cuanto al estudio de la actividad de la enzima DPP4 en el plasma se observó que, al igual que la forma soluble, sus niveles estaban disminuidos en pacientes con EM ( $p < 0,01$ ). Además, se observó una correlación entre la actividad de DPP4 y el grado de discapacidad medida por la escala EDSS. Por el contrario, la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>DPP4<sup>hi</sup> en circulación se vió aumentada en EM ( $p = 0,02$ ).

## 9. Tratamientos en EM

En la actualidad existen catorce tratamientos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*, EEUU) para el tratamiento de la EM (Figura 17):

### 9.1. Tratamientos de primera línea: inmunomodulación

**Interferon beta:** Existen en la actualidad seis preparados comerciales de IFN que producen una reducción en el número y severidad de los brotes, y retrasan la progresión a incapacidad (241). Su mecanismo de acción es complejo, y entre sus efectos sobre el sistema inmunológico destacan la disminución de la expresión de las moléculas HLA-II con la consiguiente disminución en la activación y proliferación de linfocitos T (242,243), disminución de la migración linfocitaria por inhibición de metaloproteasas y alteración de la expresión de moléculas de adhesión (244), y promoción de la expresión de citoquinas del perfil Th2 (IL-4, IL-10) con disminución de citoquinas

proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ ). Todos estos efectos conducen a una reducción del daño neuronal y un retraso en la progresión de la enfermedad (245).

**Acetato de Glatimero:** Este fármaco, compuesto de un grupo de aminoácidos (ácido glutámico, lisina, alanita y tirosina) que se asemejan a la mielina (246), reduce la frecuencia y severidad de los brotes con la misma eficacia que el IFN- $\beta$ , pero con menor efecto sobre el número de lesiones. Actúa alterando la activación de los linfocitos T autorreactivos e induciendo linfocitos Th1 anérgicos (247), promoviendo así el desarrollo de un perfil de respuesta anti-inflamatorio (248).

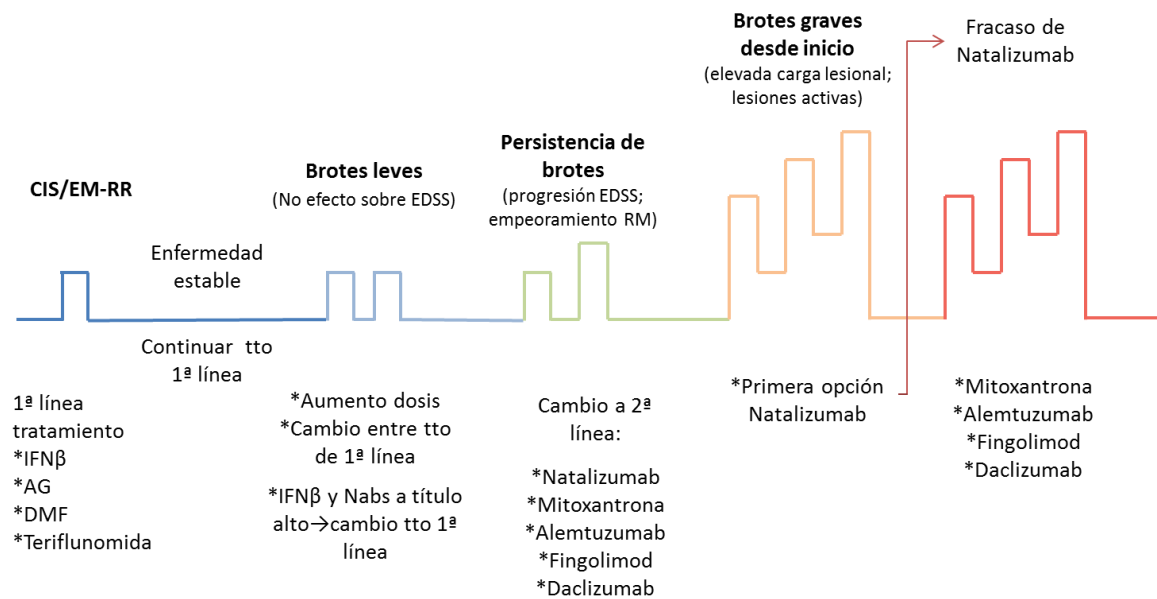
**Teriflunomida:** Se trata de un inhibidor de la dihidroorotato deshidrogenasa, enzima mitocondrial clave en la síntesis de pirimidinas requerida por linfocitos T y B (249) que provoca una reducción de la proliferación de estas células. Su uso en la EM reduce la tasa de brotes y disminuye la progresión de la enfermedad, aunque con eficacia media a moderada y no del todo demostrada a largo plazo.

**Dimetil fumarato:** Su mecanismo de acción no es del todo conocido, pero induce respuestas antiinflamatorias y de protección celular a través del factor nuclear Nrf2, relacionado con respuesta a estrés oxidativo (250). Presenta una alta eficacia en pacientes recién diagnosticados y no sometidos a ningún tratamiento previo.

## 9.2. Inhibidores de la migración linfocitaria

**Natalizumab:** Se recomienda su utilización en pacientes con brotes que no responden o no pueden tolerar otros tratamientos. Se trata de un anticuerpo humanizado que se une a la molécula de adhesión VLA-4, impidiendo la entrada de células inmunes al cerebro (251). Reduce la tasa de brotes y el número de lesiones activas. Uno de los mayores efectos adversos de este fármaco es la posible aparición de leucoencefalopatía multifocal progresiva, afección causada por la reactivación del poliomavirus JC en el SNC (252).

**Fingolimod:** Se utiliza para el tratamiento de EMRR muy activa o cuando no se ha respondido a otro de los tratamientos mencionados anteriormente. Este fármaco actúa secuestrando linfocitos en los ganglios linfáticos secundarios a través del bloqueo del receptor esfingosina-1-fosfato, que participa en la regulación del desplazamiento de estas células en el organismo (253).



**Figura 17.** Estrategia terapéutica en EM. Imagen adaptada de (254).

### 9.3. Fármacos Inmunosupresores

**Alemtuzumab:** Indicada su utilización en pacientes con EMRR activa. Es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido frente al antígeno específico de superficie CD52, el cual se expresa fundamentalmente en linfocitos B y T, causando una depleción rápida de los mismos, seguida de una repoblación lenta en los 6 y 12 meses siguientes, respectivamente (255).

**Mitoxantrona:** Se trata de un antineoplásico citostático de síntesis que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y ARN. Debido a su perfil de seguridad incierto a largo plazo, se utiliza como segunda línea para tratar pacientes con recaídas y con forma EMSP en evolución y con evidencia de empeoramiento de la discapacidad (256).

**Daclizumab:** Es el último fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con EM. Se trata de un anticuerpo monoclonal anti-CD25 que se une con alta afinidad al receptor de IL-2, altamente expresado en linfocitos T de pacientes con EM, e inhibe selectivamente su activación (257).

### 9.4. Tratamientos en desarrollo

La terapia celular con CDs se considera un potencial agente terapéutico personalizado (258) para el tratamiento de la EM y otras enfermedades de base inmunológica por su capacidad de restituir la tolerancia periférica a través de la

secreción de citoquinas antiinflamatorias (IL10, TGF $\beta$ , IDO, PD-1) y la inducción de linfocitos T<sub>Reg</sub> (259). Recientemente, ensayos *in vitro* han demostrado que CDs derivadas de monocitos (mo-CDs) tolerogénicas cargadas con péptidos de mielina, inducen una hiporrespuesta por linfocitos T autorreactivos de pacientes con EMRR en presencia de vitamina D.

Por otro lado, la modulación de la señalización por los PRRs podría tener también una importante función terapéutica. El IFN- $\beta$ , incrementa la expresión de los receptores TLR1 y TLR7 con el consiguiente incremento de producción de IFN tipo I (128,260), y disminuye la expresión de aquellos cuya función se asocia a un empeoramiento de la enfermedad, como TLR2, TLR9 o NLRP3 (261–263). Actualmente, hay muchos fármacos que emplean estas vías de señalización para tratar varias enfermedades como el cáncer o enfermedades respiratorias crónicas, o se utilizan como adyuvantes, como es el caso del NLRP3 (264,265). La utilización de agonistas o antagonistas de estos receptores podría regular la respuesta inmunitaria en la EM. Se ha visto que la administración a bajas dosis de agonistas de TLR7 produce una disminución en la inflamación cerebral y la respuesta autorreactiva en el modelo animal de EM, debido en parte a una hiporrespuesta de las CD (266).

---

# OBJETIVOS

El **objetivo principal** de esta memoria de tesis consiste en identificar nuevos biomarcadores sanguíneos con poder diagnóstico y pronóstico en EM en las primeras fases de la enfermedad. Para ello se utilizaron muestras obtenidas al inicio clínico de la enfermedad y utilizando como controles tanto individuos sanos como afectados por otras enfermedades neurológicas, tanto inflamatorias como no inflamatorias. A su vez, se pretende validar y consolidar el poder diagnóstico y pronóstico de los biomarcadores previamente estudiados por este grupo de investigación (174). En paralelo a esta línea de investigación, se pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos biológicos y fisiopatológicos implicados en la EM, a través del estudio de estos biomarcadores en LCR; la expresión de IP-10, CXCR3 y DPP4 en linfocitos T; y el estudio de la funcionalidad de la vía de IFN-tipo I, relacionada con la mayoría de analitos estudiados.

Un objetivo adicional es el estudio de ciertas variantes genéticas que ayuden en el diagnóstico y conocimiento de la enfermedad en varios casos de EM familiar.

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

- I. Identificar y validar nuevos biomarcadores sanguíneos con poder diagnóstico para discriminar pacientes con EM frente a controles sanos y pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias, y con poder pronóstico para diferenciar entre formas clínicas de EM.
- II. Construir un algoritmo diagnóstico que sirva como herramienta sencilla en la práctica clínica habitual, que ayude en el diagnóstico precoz y diferencial de la EM.
- III. Caracterización de la expresión y actividad de la enzima DPP4 y las isoformas de IP-10 en pacientes con EM para determinar su posible implicación en la patogénesis de la enfermedad.
- IV. Estudio de los biomarcadores en LCR que puedan contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que tienen lugar en las primeras fases de desarrollo de la enfermedad.
- V. Estudio de la funcionalidad de la vía de señalización de IFN tipo-I en las distintas formas clínicas de EM para identificar posibles defectos funcionales en estos pacientes.
- VI. Estudio de biomarcadores genéticos en pacientes con EM familiar que ayuden en el diagnóstico y conocimiento de la enfermedad.

---

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **Diseño de estudio**

Se trata de un estudio observacional prospectivo en el que se han estudiado pacientes con EM y otras enfermedades neurológicas e individuos sanos, procedentes todos ellos de tres hospitales de la Comunidad de Madrid: Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Hospital Ramón y Cajal y Hospital Clínico San Carlos, con unidades de referencia en el tratamiento de la EM.

El estudio se divide en 3 grandes bloques:

- I. Estudio de biomarcadores en suero y LCR al inicio de las manifestaciones clínicas neurológicas
  - Estudio de la expresión diferencial de biomarcadores en pacientes con EM respecto a pacientes con otras enfermedades neurológicas y controles sanos.
  - Estudio de la expresión diferencial en las distintas formas clínicas de EM que sirvan para discriminar entre formas predominantemente inflamatorias y formas neurodegenerativas.
  - Diseño de un algoritmo diagnóstico de utilidad en la práctica clínica por el cual, a través del estudio de biomarcadores sanguíneos, se consiga facilitar el diagnóstico diferencial con otras enfermedades neurológicas y entre las distintas formas clínicas de la EM.
  - Estudio de la enzima DPP4 e isoformas de IP-10 en suero y LCR en una pequeña cohorte de aproximadamente 20 individuos de cada grupo clínico para estudiar su posible papel como fuente de desregulación de biomarcadores.

La utilización de muestras obtenidas al inicio clínico de la enfermedad, antes del diagnóstico definitivo de EM, es el momento idóneo para poder extrapolar además información sobre el estado inmunológico del paciente al inicio de la enfermedad, y aproximarnos a un mayor conocimiento de la fisiopatología y de los mecanismos implicados en su aparición. Adicionalmente, el estudio de muestras pareadas de suero y LCR, obtenidas simultáneamente, permite conocer más de cerca los eventos locales del SNC que están alterados en la EM, al tratarse de una enfermedad autoinmune organoespecífica.

Por otro lado, la inclusión en el estudio de pacientes con otras enfermedades neurológicas tanto inflamatorias como no inflamatorias permite favorecer el diagnóstico diferencial como en la vida real, y determinar qué marcadores tienen un papel específico

en la enfermedad y cuáles son el reflejo únicamente de procesos neurológicos inespecíficos.

## II. Aproximación en la evaluación funcional de la vía del IFN-tipo I

- Estudios funcionales en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y fibroblastos de las formas clínicas EMRR y EMPP, para identificar posibles defectos funcionales en la vía de señalización del IFN-tipo I.

El estudio de estas vías de señalización tanto en PBMCs como en fibroblastos permite evaluar en paralelo la funcionalidad de las vías tanto a nivel periférico (PBMCs) como a nivel del SNC (los fibroblastos presentan muchas similitudes a nivel de PRRs con las células del tejido nervioso).

## III. Estudio de EM familiar

- Estudio de la influencia de ciertas variantes genéticas (SNPs) en la susceptibilidad a padecer la enfermedad en dos familias con 3 y 4 casos de EM cada una, en base a los resultados obtenidos en el análisis del exoma completo en cuatro de ellos.

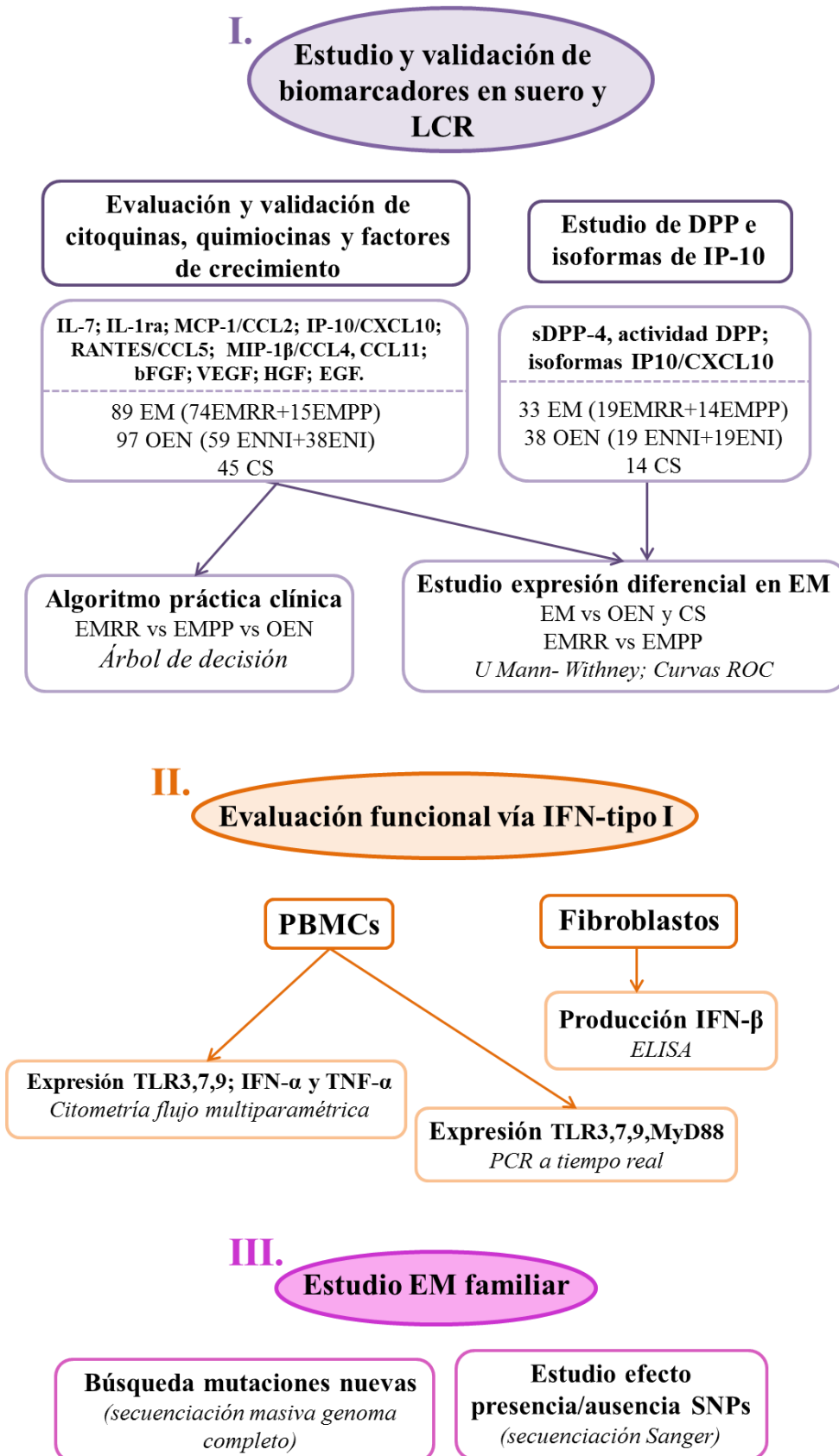


Figura 88. Esquema del estudio y plan de trabajo.

## **I. Estudio de biomarcadores en suero y LCR**

### **I.1. Evaluación y validación de un panel de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento**

#### **1. Sujetos y período de estudio**

Este estudio se llevó a cabo sobre un total de 89 pacientes con EM, 97 pacientes con OEN y 43 CS. Las muestras biológicas y los datos asociados de los pacientes incluidos en el estudio fueron recogidas, procesadas y cedidas por el Biobanco del Hospital Clínico San Carlos-IdISSC integrado en la Plataforma de la Red Nacional de Biobancos Hospitalarios (RetBioH; [www.redbiobancos.es](http://www.redbiobancos.es)) siguiendo procedimientos normalizados de trabajo y con la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico del hospital. En la Tabla 4 se recogen las variables clínicas de los individuos incluidos en el estudio. El valor de EDSS medido por la escala de Kurtzke (19), corresponde al momento de debut clínico.

	CS	ENNI	ENI	EMRR	EMPP
Número de pacientes	43	59	38	74	15
Género (M/F)	11/32	22/37	15/23	18/56	5/10
Edad (años)*	31 (27-42)	58 (40-76)	45 (32-61)	33 (29-43)	54 (42-58)
EDSS*	N/A	N/A	N/A	1.8 (1.0-2.0)	3.5 (3.0-5.5)

**Tabla 1.** Datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes incluidos en el estudio de citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. CS: controles sanos; ENNI: enfermedades neurológicas no inflamatorias; ENI: enfermedades neurológicas inflamatorias; EMRR: EM remitente recurrente; EMPP: EM primaria progresiva; EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad; MSSS: escala de severidad de EM. \*Mediana (percentiles 25 y 75).

**Pacientes con esclerosis múltiple:** de los 89 pacientes incluidos en el estudio, 74 presentan la forma EMRR y 15 la forma EMPP. El diagnóstico se realizó siguiendo los criterios de McDonald (94), y las muestras de todos ellos fueron extraídas al inicio clínico de la enfermedad, antes de realizarse el diagnóstico definitivo de EM. Ninguno de ellos estaba por tanto en tratamiento en el momento de la toma de muestra.

#### **Grupos Control:**

- Controles sanos:

Este grupo incluye 43 individuos voluntarios del Hospital Clínico San Carlos, a los que se les extrajo una muestra de sangre (suero y PBMCs). Ningún control presentaba antecedentes familiares de enfermedad autoinmune y sin infecciones en el momento de la toma de muestra.

- **Individuos con otras enfermedades neurológicas:**

Se estudiaron un total de 97 pacientes que incluye 59 pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias (ENNI) y 38 con enfermedades neurológicas inflamatorias (ENI), según la clasificación de la 11<sup>a</sup> Revisión de la Clasificación Internacional de enfermedades (267). El grupo de ENNI incluye individuos afectados por un amplio espectro de enfermedades que incluyen hipertensión intracraneal, demencia, síndrome confusional, infarto cerebral, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, epilepsia de causa no inflamatoria y déficit cognitivo agudo. Por otra parte, el grupo de pacientes con ENI incluye individuos con infecciones y procesos autoinmunes entre otros: encefalitis autoinmune, encefalitis viral, meningitis linfocitaria, meningitis viral, afectación neurológica por el VIH, encefalomielitis, neuromielitis óptica y mieloradiculitis por VVZ (Anexo I).

## **2. Extracción y procesamiento de muestras**

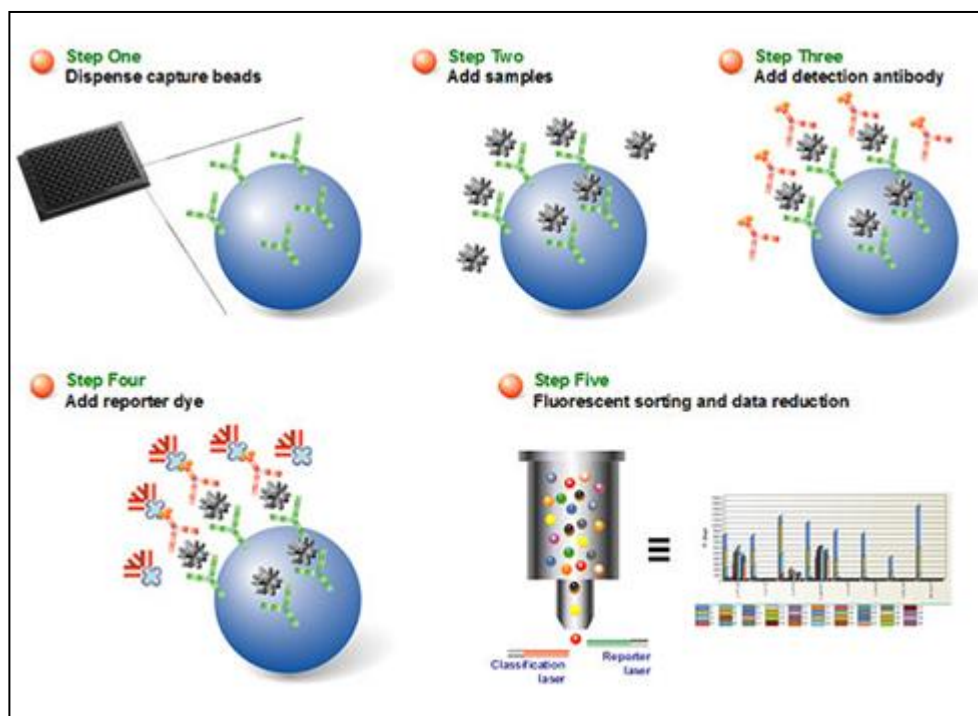
La obtención de muestras de suero y LCR se llevó a cabo el mismo día y simultáneamente. Para la obtención de muestras de suero se realizó una punción venosa, y la sangre fue recogida en tubos estériles BD Vacutainer sin anticoagulantes, y procesada en las 4 horas posteriores a la extracción. Tras producirse la coagulación, la muestra se centrifugó a 2330g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente el suero se congeló a -80°C hasta su utilización.

Las muestras de LCR fueron obtenidas por punción lumbar no traumática, centrifugadas a 1000g a 4°C durante 10 minutos para eliminar células y restos de material insoluble, e inmediatamente almacenadas a -80°C hasta su análisis.

## **3. Análisis multianalito por tecnología Luminex**

Se estudiaron un total de 12 biomarcadores seleccionados en el estudio transversal previo por nuestro grupo de investigación (240). Estos biomarcadores incluyen las siguientes citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento: interleucina 7 (IL-7), antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1ra), proteína quimioatrayente de

monocitos 1 (MCP-1/CCL2), proteína inducible por interferón-gamma 10kD (IP-10/CXCL10), quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T (RANTES/CCL5), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\beta$ /CCL4), eotaxina (CCL11), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF).



**Figura 19.** Representación del análisis multianálisis por tecnología Luminex. Extraída de <http://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/bio-plex-multiplex-immunoassays>.

Para su evaluación se utilizó la tecnología Luminex xMAP en un ensayo a medida (Bio-Rad Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de un inmunoensayo que emplea microesferas magnéticas donde cada grupo de estas microesferas tiene unido un anticuerpo de captura específico de cada molécula a estudiar. Estas microesferas presentan un tamaño y fluorescencia específicos gracias a lo cual es posible la identificación de un gran número de parámetros en una sola muestra (Figura 19). En primer lugar, se incubaron las microesferas con las muestras, que en el caso de muestras de suero se diluyeron 1/4 y en el caso del LCR se analizaron sin diluir, pero añadiendo 5% de albúmina de suero bovino (BSA) para minimizar la influencia de proteínas que pudieran interferir en el ensayo. Así, la proteína presente en las muestras se une a los anticuerpos de captura presentes en cada grupo de

microesferas. La utilización de esferas magnéticas permite minimizar las pérdidas en los lavados. La incubación posterior con un anticuerpo biotinilado permite detectar la presencia y cantidad de molécula que se ha unido a través del revelado con estreptavidina unida al fluorocromo ficoeritrina (PE).

Se realizaron un total de 6 ensayos en placas de 96 pocillos incluyéndose en cada una de ellas muestras de todos los grupos estudiados (CS, ENNI, ENI, EMRR, EMPP) para minimizar la variación interensayo. Las placas se analizaron con el equipo Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader (Bio-Rad). Se realizaron curvas estándar de ocho puntos para el análisis de cada analito. El límite inferior para cada molécula se determinó estableciendo un valor de corte conjunto para todos los ensayos de manera que se perdiesen el mínimo de valores cercanos al límite de detección del ensayo. Estos valores de corte fueron (en pg/ml): FGFb (2,22), IL-1ra (LCR: 9,5), MIP-1 $\beta$  (1,55), eotaxina (1,33), VEGF (1,58), RANTES (0,73), EGF (4,22), IL-7 (2,3), MCP-1 (3,14), IP-10 (3,85), Mig (3,17). Puesto que la tasa de detección de eotaxina y EGF en LCR fue menor al 10% en cada uno de los grupos, estas variables se excluyeron de los análisis. Sólo en el caso de la concentración de RANTES en suero se observaron valores superiores al punto más alto de la curva, y su análisis también fue excluido puesto que estos valores perdidos representaban aproximadamente el 51% de uno de los grupos (EMRR).

## **I.2. Estudio de DPP4 e isoformas de IP-10**

### **1. Sujetos de estudio**

Para este estudio, se escogió al azar un número pequeño de muestras de cada uno de los grupos de estudio anteriores y se analizaron niveles de DPP4 solubles, actividad DPP e isoformas de IP-10, tanto en suero como en LCR. Los datos demográficos de estos pacientes se muestran en la Tabla 5.

### **2. Cuantificación de sDPP4**

Los niveles en suero y LCR de la forma soluble de la DPP (sDPP) 4 se analizaron utilizando el ELISA comercial *human DPP4/DPP4 Duo Set ELISA* (R&D Systems, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, placas Maxisorp (Nunc) fueron recubiertas con 2 $\mu$ g/ml del anticuerpo de captura durante toda la noche a temperatura ambiente. Las muestras de suero se diluyeron 1/1000 en

PBS-1% BSA mientras que las de LCR no requirieron dilución para este ensayo. Se incluyó una curva estándar de siete puntos por diluciones seriadas partiendo de una concentración de 4000 pg/ml. La concentración de sDPP4 se midió por absorbancia a 450 nm con el dispositivo Labsystems Multiskan MS (Thermo).

	CS	ENNI	ENI	EMRR	EMPP
<b>Número de pacientes</b>	14	19	19	19	14
<b>Género (M/F)</b>	5/9	7/12	9/10	4/15	4/10
<b>Edad (años)*</b>	29 (27-36)	57 (36-75)	46 (32-63)	33 (27-43)	54 (41-57)
<b>EDSS*</b>	N/A	N/A	N/A	1.5 (0-3.25)	3.5 (2.75-5.13)
<b>MSSS*</b>	N/A	N/A	N/A	2.29 (0.67-6.59)	5.24 (4.39-8.04)

**Tabla 2.** Datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes incluidos en el estudio de DPP e isoformas de IP-10. CS: controles sanos; ENNI: enfermedades neurológicas no inflamatorias; ENI: enfermedades neurológicas inflamatorias; EMRR: EM remitente recurrente; EMPP: EM primaria progresiva; EDSS: Escala Expandida del Estado de Discapacidad; MSSS: escala de severidad de EM. \*Mediana (percentiles 25 y 75).

### 3. Actividad funcional de la DPP4

Para medir la actividad enzimática de la DPP4 se utilizó el kit *DPP-4-Glo™ protease Assay* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo utiliza la enzima luciferasa para revelar la actividad de la DPP4. En primer lugar se ponen en contacto la muestra y un sustrato de la DPP4, la Gly-Pro-aminoluciferina, de manera que cuando la DPP4 presente en la muestra actúa sobre él, se libera aminoluciferina, sustrato de la luciferasa. La acción de la luciferasa se midió en el luminómetro Tristar LB941 device (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA) que proporciona un valor de luz emitida (RLU: unidades relativas de luz), proporcional a la actividad de la DPP4. Las muestras de suero se diluyeron 1/100 y 1/500 en 10 mm Tris-HCL pH 8 con 0,1% del estabilizador de proteínas Prionex®, y las muestras de LCR se analizaron a una dilución de 1/5. Se realizaron diluciones seriadas para asegurar que todos los valores estaban dentro del área lineal de la curva, y la actividad se expresa como U/ml.

### 4. Isoformas de IP-10

La determinación de las formas agonista (1-77 aminoácidos) y antagonista o truncada (3-77 aminoácidos) de IP-10 se realizó con la tecnología ultrasensible SiMoA (*single molecule array*). Para ello se siguió un protocolo *in house* ampliamente validado



y decrito (268), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras de suero y LCR se diluyeron 1/6 y el límite de detección fue de 1 pg/mL para ambas isoformas. La lectura se efectuó en el analizador *Simoa HD-1 Analyzer* (Quanterix Corporation, Lexington, USA).

## **II. Evaluación funcional de la vía de IFN-tipo I**

Para el estudio de la funcionalidad de la vía de IFN-tipo I en pacientes con EM, se analizó la respuesta de producción de citoquinas, genéticas (ARNm) y fenotípicas, de PBMCs y fibroblastos frente a determinados estímulos, en particular de los receptores TLR y RLR, para identificar posibles defectos funcionales en estas vías de señalización. Se analizaron por un lado la expresión de TLR (en PBMCs) por citometría de flujo y por concentración relativa de ARNm, y por otro la producción de ciertos productos resultado de la señalización (TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  en PBMCs; IFN- $\beta$  en fibroblastos).

### **1. Análisis de expresión de TLR en PBMCs**

#### **1.1. Estudio de expresión de TLR y proliferación por citometría de flujo**

Se evaluó la expresión de los TLR 3, 7 y 9 en CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, monocitos y linfocitos B en un total de 8 pacientes EMRR y 4 CS.

Las PBMCs se obtuvieron por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, RU) a partir de muestras de sangre extraídas en tubos de He-Li (BD Vacutainer® Litium Heparin). Un total de  $1 \times 10^6$  PBMCs se cultivaron en placas de 48 pocillos (500 ml/pocillo) con RPMI suplementado con glutamina y se añadieron los estímulos que figuran en la Tabla 6.

Estímulo	Vía estimulada	Concentración	Casa comercial
\$			
Poly (I:C)	TLR3 - RIG-I/MDA-5	25 $\mu$ g/mL	Invivogen
Imiquimod R-848	TLR7/8	3 $\mu$ g/mL	glsynthesis
ODN	TLR9	0,5 $\mu$ g/mL	Sigma-Aldrich®
LAMP	TLR3/7/8/9 - RIG-I/MDA-5	1 $\mu$ g/mL	Innovative Peptide Solutions
EBNA*	TLR3/7/8/9 - RIG-I/MDA-5	0,5 y 1 $\mu$ g/mL	Innovative Peptide Solutions
HHV-6*	TLR3/7/8/9 - RIG-I/MDA-5	0,5 y 1 $\mu$ g/mL	Innovative Peptide Solutions

**Tabla 6.** Estímulos y condiciones empleadas en los ensayos funcionales. \*Sólo se analizó expresión de TLRs 3 y 9 en CD<sub>4</sub><sup>+</sup> tras estimulación con EBNA y HHV-6.

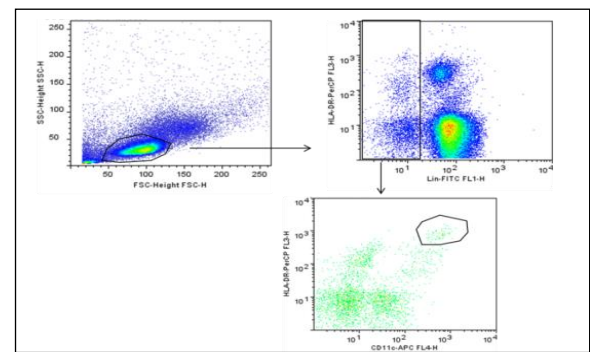
Tras 24 horas de incubación, se recogieron las células y se procedió a su marcaje con fluorocromos (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) para el estudio por citometría (Tabla 7). Como control negativo se utilizaron un tubo sin marcar y un control isotópico. Para el marcaje en la superficie celular, se incubaron las células con los correspondientes anticuerpos monoclonales durante 20 minutos a temperatura

ambiente y en oscuridad, incluyendo la solución FcR Blocking Reagent (MiltenyiBiotec) que evita las uniones inespecíficas.

	FITC	PE	PerCP	APC
Control isotópico	anti-IgG <sub>1</sub>	anti-IgG <sub>1</sub>	anti-IgG <sub>1</sub>	anti-IgG <sub>1</sub>
CDs	anti-BDCA-2	anti-TLR3	anti-lin	anti-BDCA-1
	anti-BDCA-2	anti-TLR7	anti-lin	anti-BDCA-1
	anti-BDCA-2	anti-BDCA-1	anti-lin	anti-TLR9
Mos y LBs	anti-CD14	anti-TLR3	anti-CD19	anti-TLR9
	anti-CD69	anti-TLR7	anti-CD19	anti-CD14

**Tabla 7.** Anticuerpos monoclonales empleados para el inmunotipaje y análisis de expresión de TLR en CDs, monocitos y linfocitos B. CD: células dendríticas; Mos: monocitos; LBs: linfocitos B; lin: linaje (CD3, CD19, CD14, CD56).

Tras varios lavados con PBS/BSA (1600 rpm, 5 minutos), se procedió a la permeabilización de las células para el marcaje intracelular con la solución de fijación y permeabilización *Inside Stain Kit* (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se marcó con los anticuerpos monoclonales anti-TLR. Tras la incubación de 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y dos lavados posteriores, se adquirieron un total de 20.000 eventos utilizando el citómetro FACSCalibur (BectonDickinson). El análisis posterior se realizó con el software CellQuest (BectonDickinson). Monocitos y linfocitos fueron seleccionados por tamaño y complejidad (forward/side scatter) y en base a la expresión de CD14 y CD19 respectivamente. Para CDs, se seleccionaron en primer lugar por tamaño y complejidad para posteriormente seleccionar aquellas células negativas para linaje y positivas para DR. En todas ellas se analizó la expresión de los TLR3, 7 y 9 (Figura 20).



**Figura 209.** Estrategia de gateo para la caracterización de la expresión de TLR3, TLR7 y TLR9 en CD.

Además, se estudió la respuesta proliferativa de linfocitos T a estos estímulos, para lo que se utilizó tinción con Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE). Tras la estimulación, las PBMCs se resuspendieron en PBS para la tinción con CFSE (1µM) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C con agitación cada minuto. Estas células

permanecieron en cultivo 6 días y posteriormente fueron teñidas con los anticuerpos de membrana CD4/PE, CD19/PerCP y CD8/APC.

## 1.2. Estudio de expresión de ARNm

Se estudiaron en total 4 pacientes (2 EMRR y 2 EMPP) y 2 CS. Las PBMCs se aislaron por gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, RU) a partir de muestras de sangre extraídas en tubos de EDTA (BD Vacutainer® K2 EDTA).

Se cultivaron un total de 500.000 PBMCs en placas de 48 pocillos (500 mL/pocillo) con RPMI suplementado con glutamina. El remanente de células se utilizó como control de expresión basal. Las células en cultivo se incubaron durante 30 minutos con polymixina B (Sigma Aldrich) (50 mg/mL) previamente a los estímulos. Se trata de un antibiótico polipeptídico que elimina restos de LPS presentes en la muestra. A continuación se añadieron los estímulos (Tabla 8) y las células se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

Condiciones	Vía estimulada	Concentración	Casa comercial
\$			
poly I:C	TLR3-RIG-I/MDA-5	50µg/mL	Invivogen
R-848	TLR7/8	5µg/mL	glsynthesis
ODN	TLR9	5µg/mL	Sigma-Aldrich®

**Tabla 8.** Estímulos y condiciones empleadas en el ensayo de expresión de ARNm de TLRs y MyD88..

Pasadas 2 horas de incubación, se recogieron las células de las condiciones \$, poly I:C y R-848, y a las 5 horas las células estimuladas con ODN, para posteriormente proceder a la extracción de RNA.

EL ARN de las PBMCs se aisló utilizando el kit *RNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, CA, USA). La concentración y pureza del ARN se midió por espectrofotometría (Nanodrop, ThermoScientificNanoDropProducts, Wilmington, DE, USA) obteniéndose concentraciones de entre 10,6 y 118,3 ng/µL y un cociente de absorbancia a 260/280 de entre 1,8 y 2. El ARN diluido en agua libre de nucleasas fue almacenado a -80°C. Previo al paso de ARN a ADNc, se realizó un tratamiento con DNAsa (TURBO DNase de ambion, lifetechnologies) que fue inactivada posteriormente con EDTA a 15mM y 75°C. El paso a ADNc se realizó por RT-PCR (High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix, AppliedBiosystems, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para medir la pureza del ADNc se determinaron los ratios 260/280 y 260/230. Posteriormente, las muestras se congelaron a -20 °C hasta su utilización.

La expresión de los genes TLR3, TLR7, TLR9 y Myd88 se midió por PCR cuantitativa (qPCR) utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems, USA). La cuantificación de ARNm es relativa ya que se compara con la expresión de un gen constitutivo (control endógeno), que en este caso fue el EF1. El nivel de expresión de cada gen se evaluó de acuerdo al método delta-Ct ( $\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gen problema}} - \Delta Ct_{\text{endógeno}}$ ), donde niveles bajos de  $\Delta Ct$  representan un mayor número de copias de ARNm amplificado.

## 2. Análisis de expresión de los productos de la vía de señalización

### 2.1. Estudio de producción de IFN- $\alpha$ y TNF- $\alpha$ por células dendríticas

En este estudio se evaluó la expresión de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  por CDs de 2 pacientes con EMRR y 3 CS por citometría de flujo. En este caso, la estimulación se realizó con los péptidos virales EBNA (0,5 o 1  $\mu\text{g/mL}$ ) y VHH-6 (0,5 o 1  $\mu\text{g/mL}$ ) (Innovative Peptide Solutions). A las 2 horas de cultivo se añadió Brefeldina A de *Penicillium brefeldianum* (Sigma Aldrich) (10  $\mu\text{g/mL}$ ), inhibidor del transporte de proteínas que favorece su acumulación en el interior celular. Tras 5 horas de cultivo se estudió la expresión de estos marcadores por citometría de flujo (estrategia de tinción y gateo similar a la anterior (Figura 20)).

### 2.2. Estudio de producción de IFN- $\beta$ en fibroblastos

Se obtuvieron fibroblastos de un total de 8 pacientes, 5 con la forma EMRR y 3 con la forma EMPP. Para ello se realizó una biopsia de piel (punch) en la cara interna del brazo, previa desinfección con alcohol de 96° y aplicación de un anestésico local. El tamaño aproximado de las biopsias fue de 3 mm<sup>2</sup> y 1mm de profundidad, y fue depositada en una solución salina estéril durante unas horas hasta su cultivo.

La muestra de piel se fraccionó con ayuda de un bisturí en numerosas secciones milimétricas que se dispusieron en frascos de cultivo con medio completo (DMEM + antibióticos (Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina (1%)) + FCS (10%)). Tras varias semanas de cultivo y una vez alcanzada la confluencia celular del 70-80%, se dió un pase a los cultivos mediante lavado con PBS y posterior tratamiento con tripsina (Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red; Life technologies) para permitir la separación celular. Tras 3-5 pases y una vez conseguido el suficiente número de células, se procedió a su cultivo.

De todos los pacientes incluidos en el estudio, se compararon líneas de fibroblastos de un CS, una paciente EMRR y un paciente EMPP. Se dispusieron un total de 100.000 células/pocillo en un volumen de 0,5 mL en placas de 24 pocillos. Se dejaron incubando durante 24 horas antes de añadir los estímulos, excepto en la condición que incorporaba IFN- $\alpha$ , que se añadió en ese momento (24 horas antes del estímulo). Al día siguiente se retiró el medio y se añadió medio fresco ya con los estímulos añadidos (Tabla 9).

Estímulo	Concentración	Casa comercial
\$		
pI:C	25 $\mu$ g/mL	Invivogen
pI:C+Lipofectamina	12,5 $\mu$ g/mL	Invivogen & Life technologies
pIC+IFN- $\alpha$	25 $\mu$ g/mL & 1.000 IU/mL	Invivogen & Intron® A, Merck Co
Resiquimod (R-848)	3 $\mu$ g/mL	glsynthesis
ODN	5 $\mu$ g/mL	Sigma-Aldrich®
IL1- $\beta$	0,02 $\mu$ g/mL	R&D Systems Inc (VITRO) ®
LPS	0,1 $\mu$ g/mL	Sigma-Aldrich®

**Tabla 9.** Estímulos y condiciones empleadas en el cultivo de fibroblastos.

Los niveles de IFN- $\beta$  se analizaron utilizando el kit de ELISA comercial VeriKine-HSTM Human IFN Beta Serum ELISA Kit (pbl assay science, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se incubaron las muestras con el anticuerpo anti-IFN- $\beta$  durante 2 horas. Posteriormente se incubaron con HRP (Horseradish peroxidase) conjugado a un segundo anticuerpo durante 30 minutos y posteriormente con un sustrato de la enzima, TMB (Tetramethylbenzidine). Tras otros 30 minutos de incubación con el sustrato, se paró la reacción con ácido sulfúrico al 0,5% y se determinó la cantidad de IFN- $\beta$  por absorbancia a 450nm con el dispositivo Triturus® (Grifols, España). Para determinar la concentración de IFN- $\beta$ , se incluyó una curva estándar de ocho puntos partiendo de 150 pg/ml, y realizada por diluciones seriadas.

### III. Estudio de EM familiar

#### 1. Sujetos de estudio

Se estudiaron dos familias que contaban con tres y cuatro miembros afectados de EM unidos por un parentesco de primer o segundo grado, y con uno o más hermanos, padres, tíos o abuelos sanos de al menos uno de los pacientes.

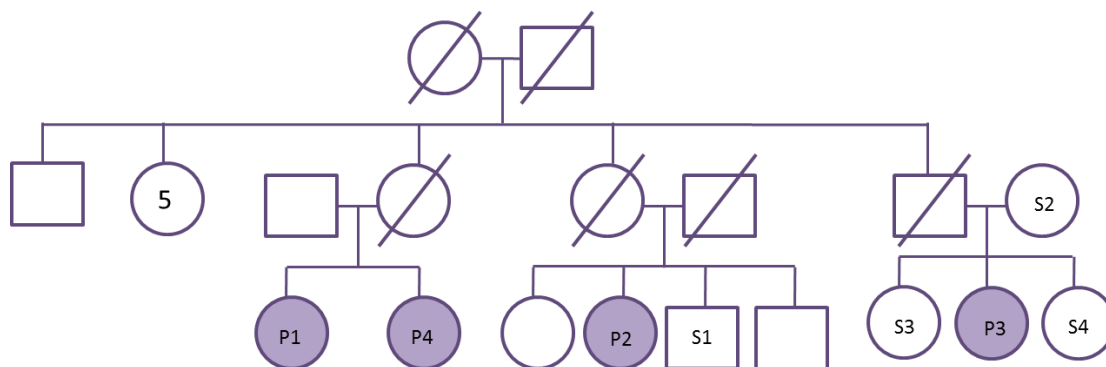
##### Pacientes con EM:

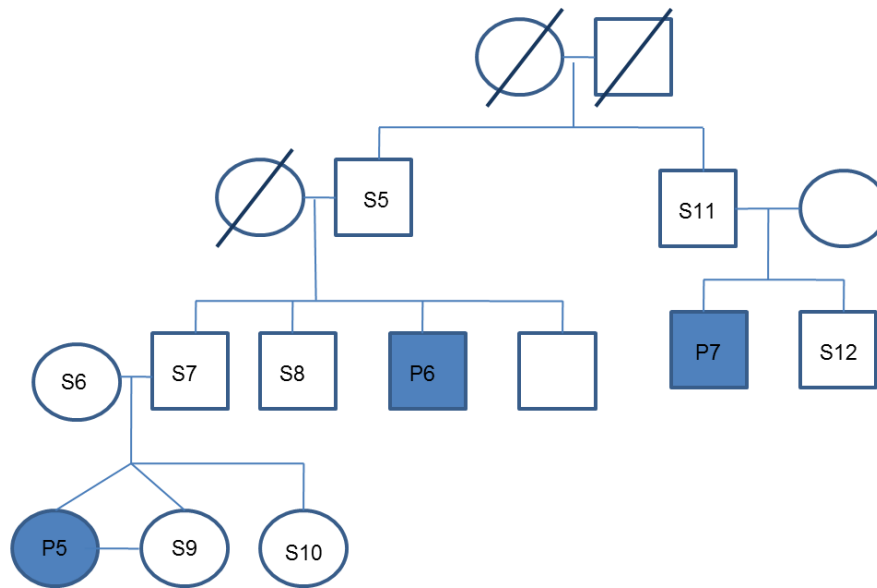
Los individuos con EM fueron diagnosticados según los criterios de McDonald en el servicio de neurología de los hospitales: Hospital General universitario Gregorio Marañón y Hospital Clínico de Salamanca (familia 1), y Hospital Clínico San Carlos (familia 2). Todos ellos dieron su consentimiento informado para la realización del estudio.

##### Familiares sanos:

Todos los familiares sanos incluidos en el estudio cumplían los siguientes requisitos:

- Ser familiares de primer o segundo grado de los pacientes EM.
- No tener ni haber tenido nunca evidencia clínica de la enfermedad (se descarta la práctica de exploraciones paraclínicas como RM craneal o estudio de BOC).
- No padecer ninguna otra enfermedad de posible origen autoinmune.
- No haber presentado ningún tipo de infección o proceso inflamatorio en el momento de la extracción.
- No haber recibido tratamiento con corticoides en los dos meses previos a la extracción.
- No haber recibido tratamiento inmunosupresor.





**Figura 21.** Árbol genealógico de las dos familias con EM (familia 1 arriba, y familia 2 abajo) incluidas en el estudio genético. Pacientes afectados por la enfermedad: EMRR (P1, P3, P5, P6 y P7), EMSP (P2 y P4), individuos no afectados por la enfermedad incluidos en el estudio (S1-S12).

## 2. Extracción de ADN

Se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre periférica por punción venosa en tubos de EDTA (BD Vacutainer® K2 EDTA). Posteriormente se aisló el ADN por dos métodos diferentes:

- *Salting out*: siguiendo las instrucciones de Miller *et al.* descritas en (269).
- Partículas magnéticas: la extracción se llevó a cabo con el *kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit* (Roche, Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el equipo *MagNA Pure Compact*.

La cuantificación del ADN genómico se realizó mediante espectrofotometría con el equipo *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific, Wilmington; DE, USA) midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza del material se determinó a través del ratio de absorbancia 260/280 considerando una buena pureza valores superiores a 1,7.

## 3. Secuenciación exómica completa (WES)

La secuenciación y el análisis del exoma humano de las cuatro pacientes con EM de la familia EM-1, se realizaron en el *St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Disease* perteneciente a la Universidad Rockefeller (Nueva York, EEUU) con el secuenciador *Illumina HiSeq 2000*. Para la captura del exoma se utilizó el *kit Agilent*



*Sure Select Human All Exon 38Mb* (Agilent Technologies). La secuenciación *Single-end* se llevó a cabo mediante el analizador *Illumina Genome Analyzer IIx* (Illumina). Se alinearon las secuencias con la referencia construida del genoma humano hg19 usando el *Burrows-Wheeler Aligner* (270) y el procesamiento posterior y la búsqueda de variantes se llevó a cabo mediante las herramientas *Genome Analysis Toolkit* (GATK) (271) *Samtools* (272) y *Picard* (273). A continuación se trataron las sustituciones mediante el *GATK Unified Genotyper*. Todas las llamadas con una cobertura en la lectura  $<4x$  y los SNPs fueron filtradas y las variantes encontradas se anotaron con el *GATK Genomic Annotator*.

#### 4. Determinación SNPs de estudio

Para el estudio de SNPs, se buscaron en los datos del exoma de las pacientes SNPs coincidentes con los descritos hasta la fecha asociados a EM (69). Posteriormente se amplió la búsqueda, y se buscaron SNPs presentes en genes ya descritos asociados a EM (69), y se seleccionaron aquellos que estuviesen en desequilibrio de ligamiento (LD) con un  $r \geq 0.8$ . Para ello se utilizó la base de datos T1D (274). Todos los SNPs seleccionados para este estudio se recogen en la Tabla 10.

#### 5. Genotipado de SNPs: secuenciación

El estudio de los SNPs seleccionados se realiza mediante PCR que emplea primers específicos, uno de ellos marcado en su extremo 5' con un fluoróforo (FAM o HEX). El diseño de primers se realizó con la herramienta *Primer3* (v. 0.4.0) (275). Se utilizaron los parámetros: tamaño del *primer*: mínimo=18, óptimo=20, máximo=27; temperatura de fusión: mínimo=57, óptimo=60, máximo=73; máxima complementariedad=8; máxima complementariedad 3'=3. Se seleccionaron regiones de 300-400 pares de bases centradas en las variantes a secuenciar de manera que el amplicón tuviese un tamaño aproximado de entre 150-200 pares de bases. Los primers utilizados se indican en la Tabla 11.

SNP ID	Gen	Localización	Cambio nucleotídico	Frecuencia alelo minoritario	Alelo de riesgo
rs4648356	MMEL1	Intergénica	A/C	A=0.4681/2344 EUR: 0.3082	C
rs11810217	EVI5,RPL5	Intrón	C/T	T=0.1340/671 0.2734	A
rs41286801	EVI5,RPL5	3'ÚTR	C/T	T=0.0783/392 0.1759	A
rs2300747	CD58	Intrón	A/G	G=0.3399/1702 0.1421	A
rs1323292	RGS1	Intergénica	C/T	C=0.1298/650 0.1849	A
rs1062158	NDFIP1	Intrón	C/T	C=0.3339/1672 0.3797	A
rs4075958	RGS14	Intergénica	A/G	A=0.1845/924 0.27829999	A
rs4976646	RGS14	Intrón	C/T	C=0.4048/2027 0.3489	G
rs4810485	CD40	Intrón	G/T	T=0.2384/1194 0.25939998	A
rs2293152	STAT3	Intrón	A/C/T/G	G=0.3462/1734	C

**Tabla 10.** SNPs incluidos en el estudio de EM familiar.

La amplificación se llevó a cabo utilizando la Polimerasa *AmpliTaq DNA Polymerase* (Roche) y en condiciones óptimas para estas secuencias: 10' a 95°C, 38 ciclos (25'' a 95°C, 25'' a 58°C y 30'' a 72°C) y 7' a 72°C para la elongación final. La purificación inicial del material genético amplificado se realizó por dilución con unas concentraciones de dNTPs y *primers* menores de 100uM y 0,2uM respectivamente. Para la secuenciación por el método Sanger, se utilizó el *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific), y la amplificación se llevó a cabo en condiciones óptimas: 3' a 94°C, 25 ciclos (10'' a 96°C, 5'' a 50°C, 4' a 60°C), y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Posteriormente, el amplicón se mezcló con formamida (agente desnaturizante) y tras desnaturizar (5 min a 95°C), se llevó a cabo una electroforesis capilar en el secuenciador *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El software *GeneMapper v.32* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) se utilizó para el análisis de la secuenciación. Este software indica el tamaño del fragmento a partir del momento de la emisión de fluorescencia y asigna automáticamente el alelo.

rs ID	Primers
<b>rs4648356</b>	Forward: 5'-TTTTCCTGTCTCTTTGCATGA-3' Reverse: 5'-CTCCTGGCTTGAGGTAGCAC-3'
<b>rs11810217</b>	Forward: 5'-AGGAGGCTGAGGCTTGAA-3' Reverse: 5'- TGCCTTTGCCAGTTAGGTC-3'
<b>rs41286801</b>	Forward: 5'- TGCAATTTCCATTTTATTACACA-3' Reverse: 5'- TTTGAAGATCTGATTCAAATACACC-3'
<b>rs2300747</b>	Forward: 5'- TGCAAAAGTGTCTAGGAGTGAAA-3' Reverse: 5'- TGTCCAAGTTCACACAGCAA-3'
<b>rs1323292</b>	Forward: 5'- CTTGGAACACGGGCCTATTA-3' Reverse: 5'- TGCAACAAAAGTGAGTTTAGAAGG-3'
<b>rs1062158</b>	Forward: 5'- CATTTACATGGCACCCCTTT-3' Reverse: 5'- GATACTCCTCCTGGCCTTCC-3'
<b>rs4075958</b>	Forward: 5'- ATGCGGGCAAGTTATCCAT-3' Reverse: 5'- ACACACTCCTGGCAGCATC-3'
<b>rs4976646</b>	Forward: 5'- GAGGGCACAGTTCAAGAGGA-3' Reverse: 5'- CCCAATTCCTGAGCTTTGA-3'
<b>rs4810485</b>	Forward: 5'- ATCAGAGGGCTGGAGAAACC-3' Reverse: 5'- CCCCCTTACCTCTTTCCAG-3'
<b>rs2293152</b>	Forward: 5'- TCTTTACCCCTCTCTCCCTCA-3' Reverse: 5'- CTTTCATCCTCCGGCTACTTG-3'

**Tabla 11.** Primers utilizados en la secuenciación de polimorfismos en EM familiar.

## 6. Cálculo de “unweighted” y “weighted” genetic risk score

Para evaluar el efecto combinado de los SNPs previamente seleccionados en la susceptibilidad a padecer EM, se construyeron dos modelos multi-locus, “unweighted” y “weighted” GRS. El primero (uGRS), únicamente tiene en cuenta el número de alelos de riesgo en cada individuo, considerando los 9 SNPs. El wGRS, además de considerar el número de alelos de riesgo de cada locus, tiene en cuenta el OR de cada SNP en EM, y se calculó según la ecuación (276,277):

$$\mathbf{wGRS} = w_1 \times \text{SNP}_1 + w_2 \times \text{SNP}_2 + \dots + w_k \times \text{SNP}_k$$

donde  $\text{SNP}_i$  es el número de alelos de riesgo para ese locus (0, 1 o 2);  $k$  es el número de SNPs utilizados (9); y  $w_i$  representa el riesgo ya descrito de ese SNP en EM (log OR). De esta manera, se asume que todos los SNPs tienen un efecto aditivo. Puesto que el OR utilizado aquí es el obtenido en estudios de meta-análisis o basados en distintos tamaños muestrales y diseños, para ser conservativos y con la intención de penalizar

aquellos SNPs con un baja confianza en la estimación del OR, y así evitar la inflación de SNPs con un bajo OR, se utiliza la transformación  $w_i = \log_e \text{O.R.}$ . Para poder comparar ambas medidas del GRS, “unweighted” y “weighted”, se utiliza el factor  $k/(w_1 + \dots w_k)$  para aumentar la escala del wGRS (278):

$$\mathbf{wGRS \text{ “escalado”}} = k \times (w_1 \times \text{SNP}_1 + w_2 \times \text{SNP}_2 + \dots + w_k \times \text{SNP}_k) / (w_1 + \dots w_k)$$

## Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con SPSS (Chicago, Illinois) y *GraphPadPrism* (CA, USA).

### 1. Comparaciones 2x2: Test exacto de Fisher

Esta prueba es utilizada para medir la asociación entre dos variables cualitativas o categóricas. Se basan en comparar la frecuencia de una determinada característica en una muestra de individuos afectados por la enfermedad (casos) con la frecuencia de esa misma característica en la muestra de individuos no afectados (controles) de la misma población. Para la comparación, se realizaron tablas de contingencia 2x2, y para el cálculo de probabilidad se empleó el estadístico  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher (cuando los valores esperados fueron menores de 5).

En el análisis se escogió el valor de p de dos colas puesto que *a priori* se desconoce en qué sentido va el efecto esperado. Para calcular la fuerza de asociación se utiliza el OR y para la estimación de los intervalos de confianza (IC) al 95% de las ORs se empleó el método de Cornfield/Límites exactos. Todos estos análisis se realizaron con el programa *STatcalc* (EpiInfo v6).

### 2. Pruebas no paramétricas

#### 2.1 Significancia global: Kruskal-Wallis

Este test es el análogo no paramétrico del ANOVA (análisis de varianza de un factor). Se utiliza para comparar globalmente las diferencias entre todos los grupos de estudio y determinar si muestras independientes proceden de la misma población o de poblaciones idénticas con la misma mediana. Un resultado significativo indica que al menos una de las muestras difiere de las otras.

#### 2.2 Comparaciones de 2 muestras independientes: U Mann-Whitney

Este test permite comprobar si dos muestras aleatorias e independientes proceden de una misma población y tienen la misma distribución. Se utilizó en aquellos casos en que la prueba de Kruskal-Wallis salió significativa para comprobar cuáles eran los grupos que diferían significativamente. En los casos en que los valores de ambas muestras son idénticos, las observaciones de ambos grupos se combinan y clasifican con respecto al rango promedio asignado.

### 2.3 Asociación entre variables: Correlación Spearman

Es una medida del grado de asociación entre dos variables que se calcula a partir de la asignación de rangos a los valores ordenados. Esta asociación es nula si  $R=0$ , y va aumentando a medida que el valor de  $R$  se aproxima a 1 ó a -1. El signo del coeficiente  $R$  indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo.

A diferencia del coeficiente de correlación de Pearson, no requiere la asunción que la relación entre las variables es lineal, ni que las variables sean medidas en escalas del intervalo; puede ser utilizado para variables medidas en nivel ordinal.

### 2.4 Curvas de rendimiento diagnóstico (Curvas ROC)

Las curvas de rendimiento diagnóstico (curvas ROC: *Receiver operating characteristic*) son un buen indicador de la precisión de una prueba diagnóstica. Estas curvas son una representación de todos los pares sensibilidad (S)/especificidad (E) resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. Una prueba con discriminación perfecta tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde S y E toman valores máximos (=1). Una prueba sin discriminación, con igual distribución de resultados en los dos subgrupos, da lugar a una línea diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda hasta la superior derecha. La mayoría de las curvas ROC caen entre estos dos extremos. El área que queda entre la diagonal y la curva, denominada AUC (area under the curve), se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos sano y enfermo, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicarles la prueba diagnóstica.

Las curvas ROC se realizaron en aquellas variables significativas en la prueba de U-Mann Withney, para seleccionar el valor de los puntos de corte capaces de predecir el desarrollo de la enfermedad o forma clínica estudiada. Los puntos de corte óptimos son aquellos en que la suma de S y E fue máxima y más cercana a 2 ( $S=1$  y  $E=1$ ).

## 3. Corrección estadística

Un suceso se considera estadísticamente significativo cuando la probabilidad de que aparezca por azar es menor del 5%, pero cuando se realizan un número elevado de comparaciones la probabilidad de obtener un resultado positivo debido al azar aumenta.

Para evitar esto, realizamos la corrección de Bonferroni, que sostiene que si se efectúan un número  $K$  de comparaciones independientes, el nivel de corte a utilizar para considerar un suceso estadísticamente significativo debe ser de  $0,05/K$ . Esta corrección es la más sencilla y a la vez la más conservadora, por lo que puede estar desechando resultados significativos, aumentando los falsos negativos y reduciendo la potencia de los análisis.

#### **4. Modelo multiparamétrico: Árbol de decisión**

Se trata de un modelo de decisión multivariante jerárquico basado en un árbol binario de clasificación y regresión, cuyo objetivo es clasificar los individuos de forma que se consiga la máxima homogeneidad dentro de cada nodo, la cual es medida por el coeficiente de Gini. En nuestro estudio se empleó para predecir o clasificar un individuo con manifestaciones neurológicas en los distintos grupos de enfermedad analizados que dividimos en: individuos con otras enfermedades neurológicas distintas a EM (OEN: ENNI+ENI), pacientes con EMRR y pacientes con EMPP. El criterio de diseño del árbol es una óptima discriminación entre las tres categorías a la vez. Este modelo tiene en cuenta la prevalencia de la enfermedad, en este caso respecto a la proporción de individuos afectados de enfermedades neurológicas en Europa. Así, la prevalencia del grupo OND incluido en el estudio es del 98,53%, y la de EM del 1,47% (1,25% EMRR y 0,22% EMPP) (279). Además, este método aporta variables adicionales (surrogates) a emplear en los casos en que no se dispone del valor de la variable predictiva. El método de clasificación empleado es el QUEST, que realiza únicamente divisiones binarias, utilizando en este caso la prueba  $F$  de Fisher para evaluar a los predictores.

---

**ESTUDIO Y VALIDACIÓN DE  
BIOMARCADORES EN  
SUERO Y LCR**



## **1. Características clínicas y epidemiológicas de los sujetos incluidos en el estudio.**

### **1.1. Grupo de pacientes con esclerosis múltiple**

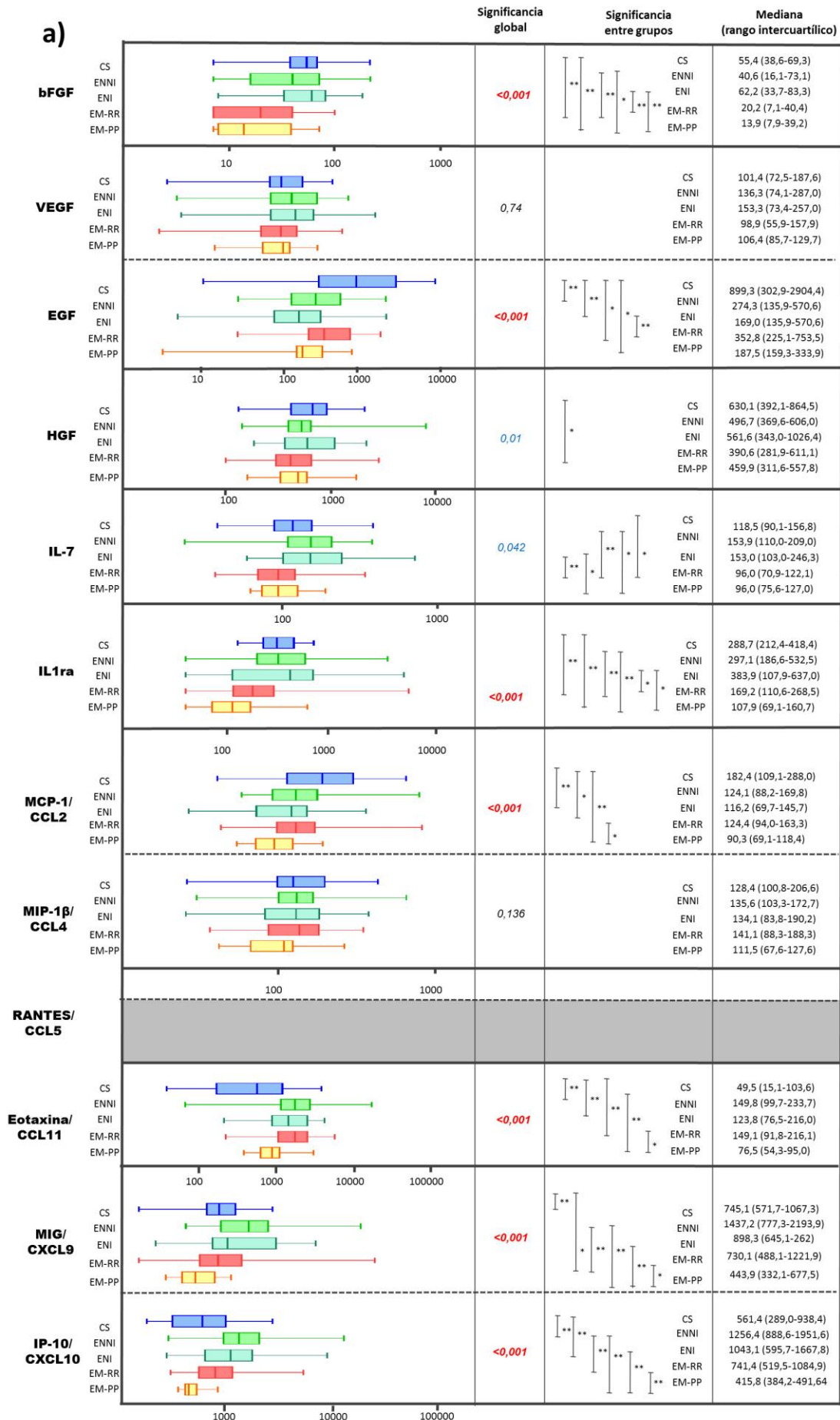
La edad de los pacientes es representativa de la edad de inicio de EM en la población mundial, en cada una de las formas clínicas estudiadas (valor mediana: 33 años en el grupo de EMRR y 54 años en EMPP). A su vez, la proporción de mujeres y hombres está bien representada en el caso de EMRR, con un cociente de 3:1, mientras que en el grupo de EMPP, esta proporción está ligeramente sobrerrepresentada (2:1) en el porcentaje de mujeres. Con respecto a la discapacidad medida por EDSS, el grupo de pacientes con la forma progresiva muestra un valor 2 veces superior al del grupo EMRR (Tabla 4).

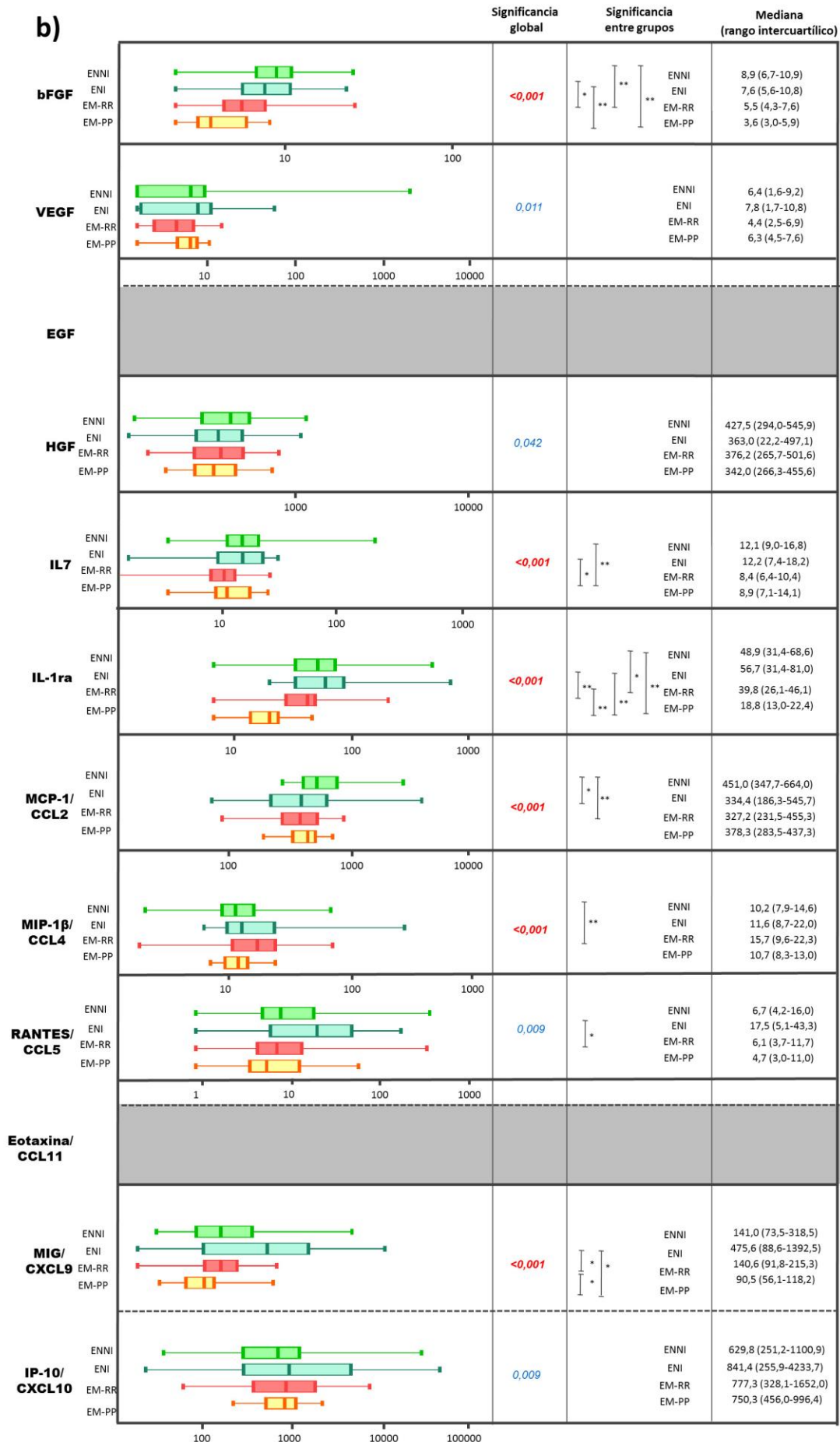
### **1.2. Grupo control**

El grupo de controles sanos muestra un rango de edad más próximo al de pacientes con la forma inflamatoria de EM, con una edad mediana de 31 años. Por otro lado, el grupo de individuos con ENNI tiene un rango de edad similar al de pacientes con la forma progresiva o no inflamatoria de EM (entre 40 y 76 años) y el grupo de ENI se acerca más al de la forma inflamatoria (EMRR) (entre 32 y 61 años). En cuanto a la distribución del cociente hombre/mujer, la proporción de mujeres es mayor en todos los casos, con un ratio de 3:1 en CS y 1,5:1 en ENNI y ENI, similares a los grupos de estudio.

## **2. Diferencias globales entre los grupos de estudio**

Las diferencias globales en los niveles en suero y LCR de los 12 analitos del panel seleccionado se evaluaron mediante el test Kruskal-Wallis, analizando conjuntamente los cinco grupos en suero (CS, ENNI, ENI, EMRR, EMPP) y cuatro en LCR (todos excepto el grupo de CS). Se encontraron diferencias significativas para la mayoría de analitos: IL-1ra, MCP-1, eotaxina, Mig y bFGF mostraron diferencias globales tanto en suero como en LCR ( $p < 0,001$  cada uno de ellos), IP-10 y EGF sólo en suero ( $p < 0,001$  ambos), e IL-7 y MIP-1 $\beta$  en LCR ( $p < 0,001$ ) (Figura 22). Los niveles de IP-10 y RANTES en LCR mostraron una tendencia que no llega a ser estadísticamente significativa tras la corrección de Bonferroni, test muy conservador empleado para corregir la multiplicidad de los test.





**Figura 22.** Niveles en suero y LCR del panel de 12 marcadores analizados en cada uno de los cinco grupos de estudio. Las diferencias globales se analizan con el test de Kruskal-Wallis. En rojo se muestran aquellos contrastes estadísticamente significativos tras la aplicación del test de Bonferroni ( $p < 0,001$ ). El análisis entre grupos se realizó mediante el test U de Mann-Whitney. Se muestran para cada analito la mediana y rango intercuartílico (mínimo-máximo), expresados en pg/ml.

Únicamente aquellos analitos que mostraron diferencias significativas en el test de Kruskal-Wallis fueron incluidos en los estudios posteriores.

### 3. Biomarcadores candidatos para el uso clínico al inicio de la sintomatología neurológica

En esta sección, se incluye el estudio de biomarcadores **en sangre** útiles para el diagnóstico y pronóstico de pacientes con EM, es decir, aquellos biomarcadores capaces de diferenciar EM de individuos sanos y de pacientes con otras enfermedades neurológicas (inflamatorias y no inflamatorias), y/o aquellos capaces de diferenciar entre formas clínicas de EM.

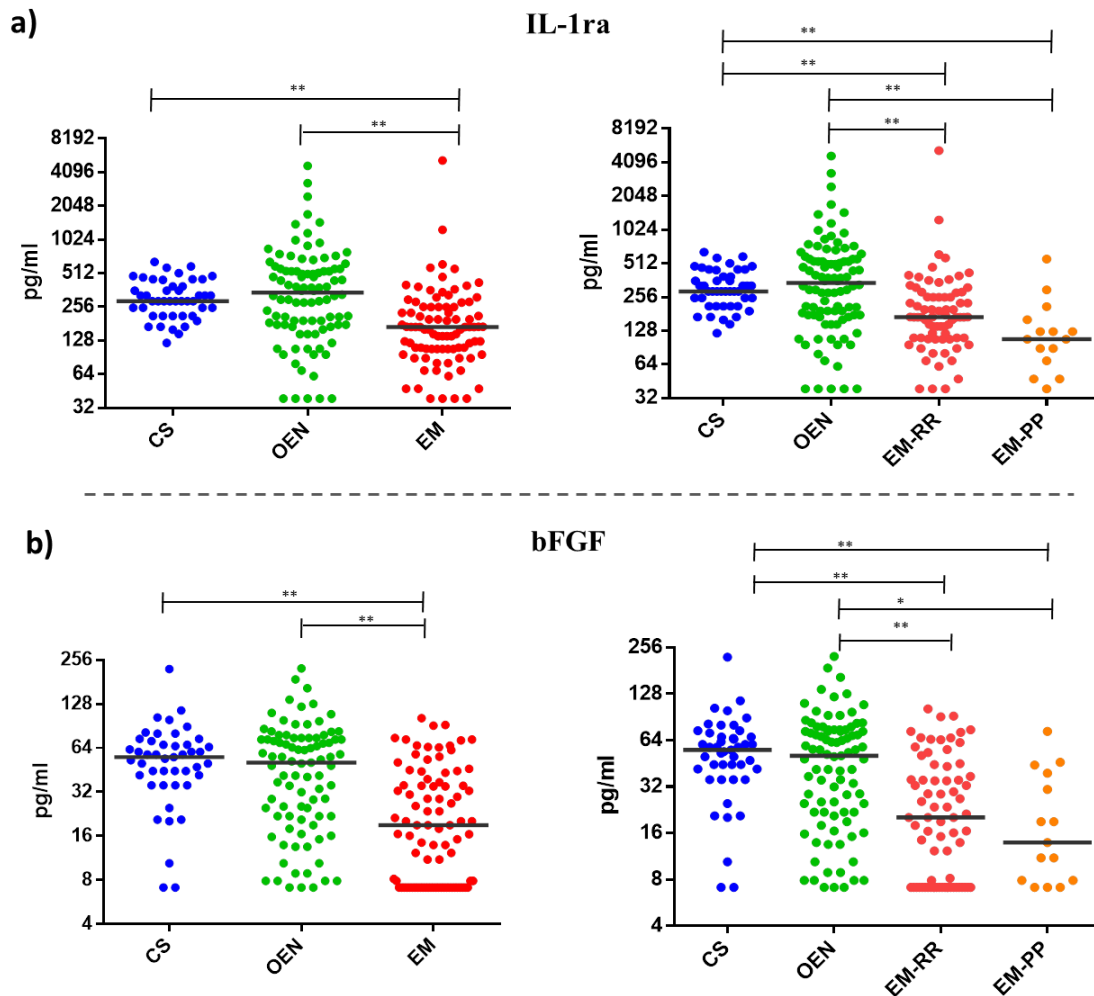
#### 3.1. Biomarcadores para el diagnóstico de esclerosis múltiple

Para determinar qué analitos eran de utilidad en el diagnóstico diferencial de EM, se analizaron diferencias entre los grupos EM y OEN. En un primer momento se analizaron las diferencias globales entre “EM” y “no-EM” (EM vs OEN), estudiando conjuntamente ambas cohortes de pacientes (EM: EMRR+EMPP). Posteriormente se analizaron las formas clínicas de EM por separado y con respecto a cada grupo control. Puesto que la mayoría de los analitos muestran niveles similares en el grupo de pacientes con OEN, sin diferencias significativas, se estudiaron conjuntamente ambos grupos, enfermedades inflamatorias y no inflamatorias, para aumentar la potencia estadística del estudio (OEN: ENNI+ENI). Por lo general, el estudio en suero muestra una disminución de los niveles de la mayoría de analitos estudiados en la EM. Esta disminución fue estadísticamente significativa para cinco de ellos (test de Mann-Whitney): IL-1ra, bFGF, IL-7, IP-10 y Mig.

##### 3.1.1. Disminución de los niveles séricos de IL-1ra, bFGF e IL-7 en EM

Las mayores diferencias se observan en los niveles de IL-1ra y bFGF, que muestran una marcada disminución en pacientes con EM, y que permanece significativa cuando se analizan por separado ambas formas clínicas (Figura 23).

Los niveles de IL-1ra en suero están significativamente disminuidos en pacientes con EM (169,2 (107,9-256,1) pg/ml) respecto al resto de grupos control (OEN (357,8 (177,5-561,2)) pg/ml,  $p<0,001$ ; CS (288,7 (212,4-418,3) pg/ml),  $p<0,001$ ). Estas diferencias permanecen cuando se analizan ambos grupos clínicos de EM por separado: EMRR (169,2 (110,6-268,5) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$ ; vs CS,  $p<0,001$ ); EMPP (107,9 (69,1-160,7) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$ ; vs CS,  $p<0,001$ ), con niveles menores en la forma progresiva (Figura 23a).

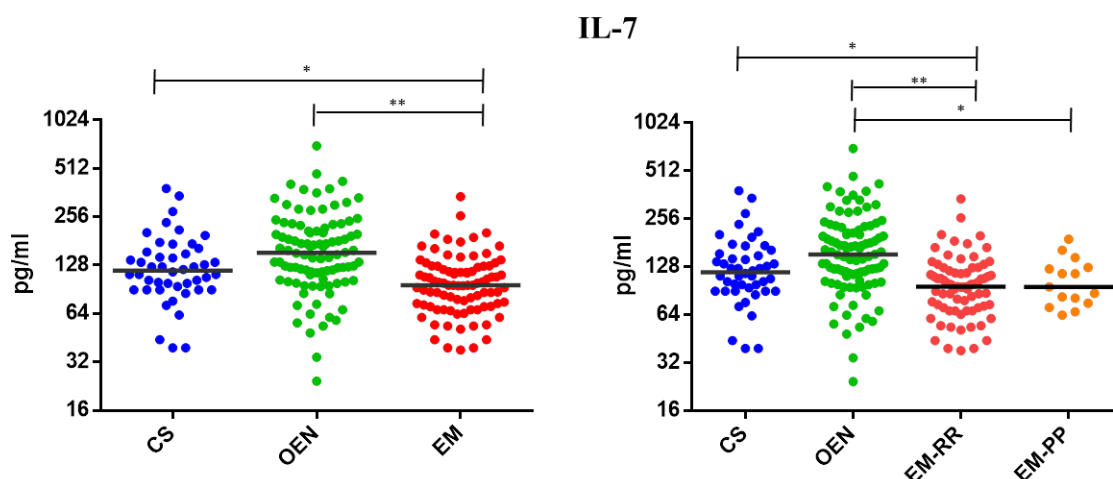


**Figura 23.** Comparación de los niveles de a) IL-1ra y b) bFGF en suero entre los grupos de controles sanos (CS), pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EM (EMRR+EMPP) tanto globalmente (izquierda) como subdivididos en EMRR y EMPP (derecha). \*\* $p<0,001$ . Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.

Similar al perfil del IL-1ra, los niveles de bFGF se encuentran significativamente disminuidos en pacientes con EM (19,0 (7,1-41,3) pg/ml) con respecto a ambos grupos de controles (OEN (50,5 (21,9-74,8) pg/ml),  $p<0,001$ ; CS

(57,7 (38,6-69,3) pg/ml,  $p<0,001$ ). Este descenso en los niveles se observa simultáneamente tanto en EMRR (20,2 (7,1-40,4) pg/ml) como en EM-PP (13,9 (7,9-13,9) pg/ml) analizados independientemente (EMRR vs OEN,  $p<0,001$ ; EMRR vs CS,  $p<0,001$ ; EMPP vs OEN,  $p=0,001$ ; EMPP vs CS,  $p<0,001$ ) (Figura 23b).

A su vez, la IL-7 muestra un perfil similar a los anteriores con una disminución significativa en la EM (96,0 (72,3-126,4) pg/ml) respecto a pacientes con OEN (152,4 (105,0-218,2) pg/ml) ( $p<0,001$ ); y respecto a CS (118,5 (90,1-156,8) pg/ml) ( $p=0,004$ ), y en ambas formas clínicas analizadas por separado, si bien la disminución es más acusada en la forma más inflamatoria de la enfermedad (EMRR), la cual mantiene diferencias significativas con CS ( $p=0,004$ ). Estas diferencias permanecen significativas cuando ambas cohortes de EM son analizadas independientemente: EMRR (96,0 (70,9-122,1) pg/ml) vs OEN ( $p<0,001$ ); EMPP (96,0 (75,6-127,0) pg/ml) vs OEN ( $p=0,002$ ) (Figura 24).

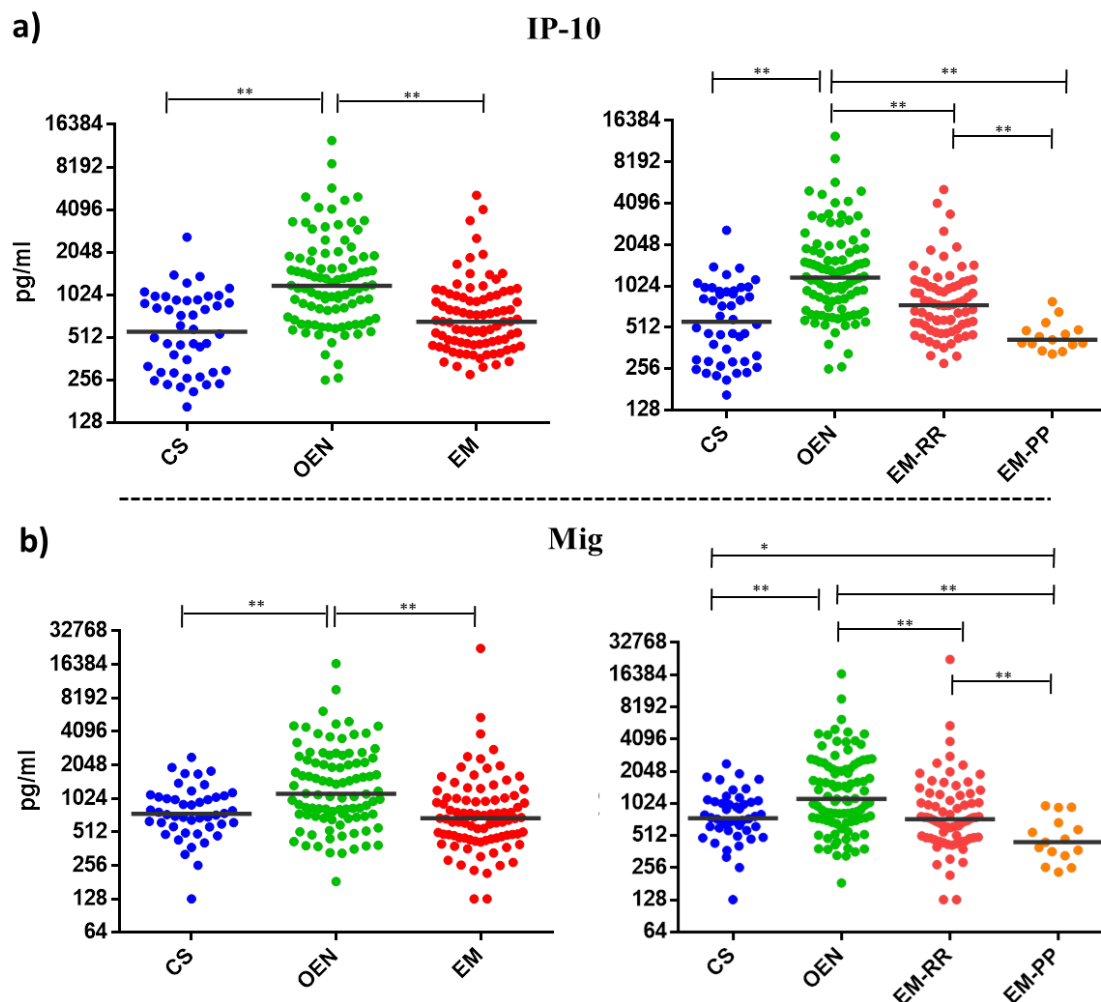


**Figura 2410.** Comparación de los niveles de IL-7 en suero entre los grupos de controles sanos (CS), pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EM (EMRR+EMPP) tanto globalmente (izquierda) como subdivididos en EMRR y EMPP (derecha). \*\* $p<0,001$ , \* $p=0,004$ . Test de Mann-Whitney. Se representan los datos individuales y las medianas.

### 3.1.2. Disminución de los niveles séricos de IP-10 y Mig en EM: niveles similares a CS

Los niveles de las  $\alpha$ -quimiocinas IP-10 y Mig están disminuidos en suero y LCR, más acusado en la forma progresiva de la EM de manera que, al analizar independientemente ambas formas clínicas, se observan diferencias significativas entre ellas (Figura 25).

Los niveles de IP-10 en suero en pacientes con EM (654,9 (460,8-999,3) pg/ml) fueron similares a los de los CS (561,4 (289,0-938,4) pg/ml), pero significativamente menores en ambos casos respecto a los presentes en controles con OEN (1194,7 (714,3-1920,1) pg/ml), que muestran un aumento en los niveles de IP-10 (EM vs OEN,  $p<0,001$ ; OEN vs CS) pg/ml,  $p<0,001$ ). Este hallazgo no sería esperable, debido a la relevancia de IP10 en los procesos inflamatorios y neuroinflamatorios en particular, si bien era compatible con resultados previos de nuestro grupo en una cohorte de pacientes transversal (240). El análisis independiente de ambas formas clínicas muestra niveles sobre todo disminuidos en pacientes con la forma progresiva, aunque en ambos casos se observan diferencias significativas respecto a OEN: EMRR (741,4 (519,5-1084,9) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$ ; EMPP (13,9 (7,9-13,9) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$ ).



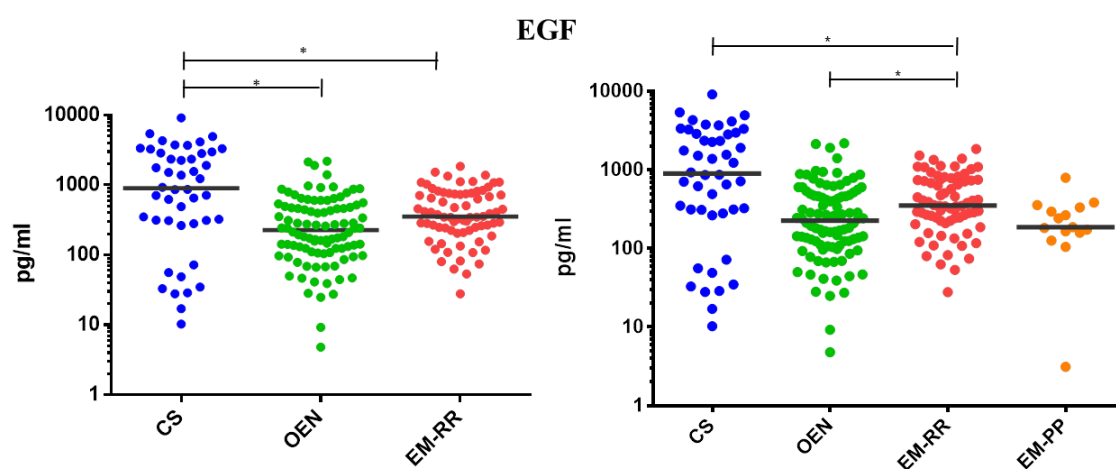
**Figura 2511.** Comparación de los niveles de a) IP-10 y b) Mig en suero entre los grupos de controles sanos, pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EM (EMRR+EMPP) (izquierda) y subdivididos en EMRR y EMPP (derecha). \*\* $p<0,001$ ; \* $p=0,001$ . Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.



Al igual que se observa en los niveles de IP-10, existen diferencias en los niveles de Mig en suero de pacientes con EM (686,9 (454,2-1029,2) pg/ml) con respecto a pacientes con OEN (1139,0 (709,9-2366,6) pg/ml) ( $p<0,001$ ), y niveles similares a los de CS (745,1 (571,7-1067,3) pg/ml). Estas diferencias también se mantienen cuando se analizan independientemente ambas formas clínicas de EM: EMRR (730,1 (488,1-1221,9) pg/ml) vs OND,  $p<0,001$ ; EMPP (443,9 (332,1-677,5) vs OND,  $p<0,001$ ). Al igual que en el estudio de IP-10, se observan niveles marcadamente menores en la forma EMPP, alcanzando en este caso diferencias significativas respecto a los CS ( $p=0,001$ ).

### 3.1.3. Aumento de EGF en suero de EMRR

Es interesante destacar también, que aunque sin diferencias con el conjunto global de EM, los niveles de EGF de pacientes con EMRR (352,8 (225,1-753,1) pg/ml) fueron significativamente mayores que en el grupo de OEN (226,5 (109,1-493,0) pg/ml) ( $p=0,001$ ), aunque inferiores a los de CS (899,32 (302,89-2904,35) pg/ml) ( $p=0,002$ ) (Figura 26).



**Figura 2612.** Comparación de los niveles de EGF en suero entre los grupos de controles sanos (CS), pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EM (izquierda) y subdivididos en EMRR y EMPP (derecha). \* $p=0,001$  (izquierda),  $p=0,002$  (derecha). Test de Mann-Whitney. Se representan los datos individuales y las medianas.

### 3.1.4. Curvas ROC para el diagnóstico de EM

Se utilizaron curvas ROC para evaluar la capacidad de los distintos analitos de discriminar EM del resto de enfermedades neurológicas y, por tanto, para determinar su



utilidad como biomarcador diagnóstico. Así, se analizaron de manera individual los distintos analitos y se establecieron como puntos de corte aquellos valores que representan la mejor combinación de especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de EM. En la Tabla 12 se representan la distribución, significación estadística, punto de corte, sensibilidad y especificidad de cada biomarcador diagnóstico. El área bajo la curva (AUC) representa el valor diagnóstico y la capacidad discriminadora diagnóstica. En todos los casos se observa una buena capacidad discriminadora de todos los analitos, con valores de AUC de entre 0,704 y 0,754. Concentraciones menores a las indicadas por el punto de corte de cada analito, servirían para clasificar individuos con EM con una elevada sensibilidad y especificidad.

	AUC	p-valor	IC 95%	Cut-off	Sensibilidad	Especificidad
<b>IL-7</b>	0,754	<0,001	(0,684-0,825)	118,0	73,0%	70,8%
<b>IL-1ra</b>	0,719	<0,001	(0,644-0,794)	286,1	80,7%	57,4%
<b>bFGF</b>	0,733	<0,001	(0,660-0,805)	47,3	81,8%	53,9%
<b>IP-10</b>	0,747	<0,001	(0,677-0,818)	808,1	66,3%	72,9%
<b>Mig</b>	0,704	<0,001	(0,629-0,779)	812,2	65,2%	68,8%

**Tabla 12.** Análisis mediante curvas ROC de la capacidad de discriminar entre pacientes con EM (EMRR+EMPP) y pacientes con OEN (ENNI+ENI) según los niveles de los biomarcadores en suero. AUC: Área bajo la curva; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

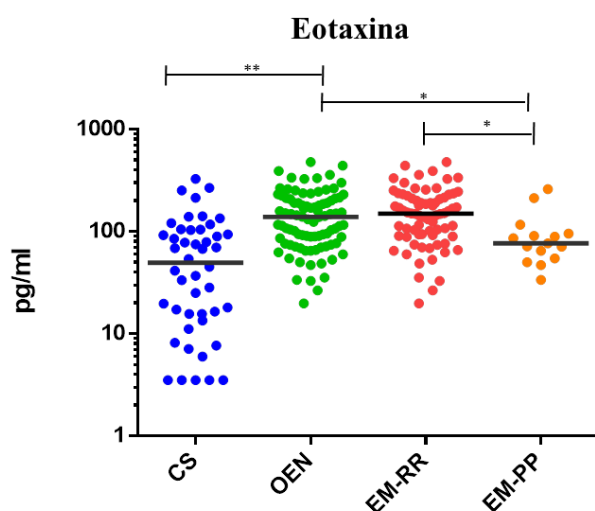
### 3.2. Biomarcadores que discriminan entre las formas clínicas de la EM

Uno de los objetivos principales del estudio es identificar biomarcadores específicos al inicio de la enfermedad clínica capaces de discriminar entre ambas formas clínicas incluidas en este estudio (EMRR y EMPP).

#### 3.2.1. Niveles disminuidos de IP-10, Mig y eotaxina en pacientes con la forma primaria progresiva de EM

Se observan en general niveles disminuidos en suero de la mayoría de analitos estudiados en la forma progresiva de la enfermedad. Esta disminución es significativa, como se mostró anteriormente en la Figura 25, en el caso de las quimiocinas IP-10 y Mig: IP-10: 415,8 (384,2-491,6) pg/ml en la EMPP versus 741,385 (519,5-1084,9) pg/ml en la EMRR ( $p=0,002$ ); Mig: 443,9 (332,1-677,5) pg/ml en la EMPP versus 730,1 (488,1-1221,9) pg/ml ( $p<0,001$ ) en la EMRR.

Además, los niveles de eotaxina también muestran niveles significativamente disminuidos entre la forma EMPP (76,5 (54,3-95,0) pg/ml) y la EMRR (149,1 (91,8-216,1) pg/ml) ( $p=0,003$ ). En este caso, el grupo de EMRR presenta niveles similares a los de controles con OEN, mientras que el grupo de EMPP muestra una disminución significativa respecto a este grupo control (143,4 (91,6-220,4) pg/ml) ( $p=0,002$ ) (Figura 27).



**Figura 2713.** Comparación de los niveles de eotaxina en suero entre los grupos de pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EMPP (izquierda)  $**p<0,001$ ;  $*p=0,003$  (EMRRvsEMPP)  $*p=0,002$  (EMPPvsOEN). Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.

### 3.2.2. Curvas ROC para el pronóstico de EM

Mediante el análisis de las curvas ROC los puntos de corte para estos 3 analitos permiten discriminar con buen rendimiento las formas clínicas EMRR y EMPP. Valores por debajo de 98,2 de eotaxina y 494 pg/ml de IP-10, respectivamente, muestran una sensibilidad del 80% de diagnóstico de EMPP, con una alta especificidad (Tabla 13).

	AUC	95% IC	p-valor	Cut-off	Sensibilidad	Especificidad
eotaxina suero	0,745	(0,610-0,880)	0,003	98,2	80,0%	71,6%
IP-10 suero	0,831	(0,734-0,927)	<0,001	494,0	80,0%	77,0%
Mig suero	0,742	(0,611-0,873)	0,003	594,4	73,3%	67,6%

**Tabla 133.** Curvas ROC que discriminan entre pacientes con EMRR de pacientes con EMPP. AUC: Área bajo la curva; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

### 3.3. Modelo de árbol de decisión para predecir el riesgo de EM

Uno de los objetivos principales de este estudio es el desarrollo de una herramienta de utilidad en la práctica clínica para el diagnóstico diferencial de la EM respecto a otras enfermedades neurológicas. Con el fin de facilitar el manejo clínico de los pacientes, se utilizaron únicamente los valores de concentración en suero. Con todo ello, se desarrolló un modelo de análisis logístico multiparamétrico como modelo predictivo, construido en base a tres grupos: cada una de las formas clínicas de EM (EMRR y EMPP) por separado y el grupo de OEN, que incluye formas inflamatorias y no inflamatorias conjuntamente. Este algoritmo tiene en cuenta las prevalencias previas de cada uno de los grupos en la población general.

El árbol comienza con un total de 89 pacientes con EM, 74 con la forma EMRR y 15 con la forma EMPP y 96 pacientes con OEN. Las variables que mejor predicen y clasifican a los pacientes con EM son la IL-7 y la IP-10 (Figura 28). En base a la clasificación obtenida con el modelo de árbol de decisión, se llevó a cabo un estudio de asociación en el que se incluía el análisis de estos dos analitos independientemente, IL-7 e IP-10, para evaluar el riesgo de “EM” frente a “no EM” (OEN) como variables dicotómicas. Posteriormente se evaluó el riesgo de cada una de las formas clínicas por separado: “EMRR” o no “EMRR” (OEN+EMPP); y “EMPP” o “no EMPP” (OEN+EMRR), y se determinaron los valores de sensibilidad y especificidad, así como el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de esta prueba. En la Tabla 14 se especifican el OR, intervalo de confianza y p-valor obtenidos tras este análisis.

Basándose en los niveles de IL-7 en suero, los pacientes con EM y OEN se distribuyen de forma que los pacientes con niveles de IL-7 por debajo de 141 pg/ml (nodo 1), representan el mayor riesgo de padecer EM (OR=6,51; IC 95%: 3,08-13,97,  $p<0,001$ ) con un 85,1% de pacientes EMRR y un 80% de pacientes EMPP. Más del 50% de pacientes con OEN presentan niveles superiores a 141 pg/ml (nodo 2). La sensibilidad y especificidad de la prueba en este punto muestran valores de 85,1% y 49,5% para EMRR y de 80% y 64,4% en el caso de EMPP, y una capacidad de descartar cada una de las formas clínicas, medida por el VPN, del 83,6% para pacientes con EMRR y del 95,5% para pacientes con EMPP.

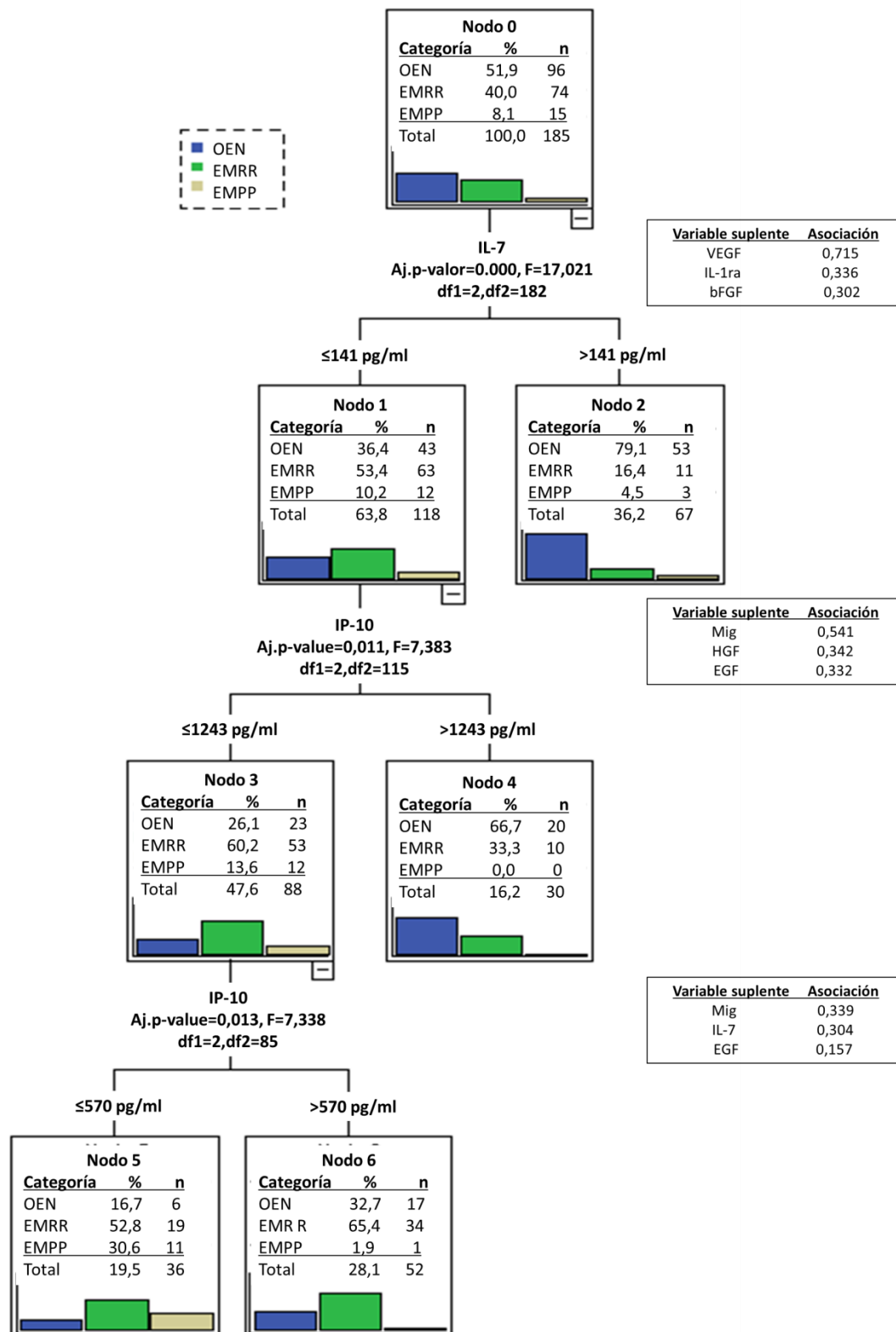
Por otro lado, la combinación de los niveles de IL-7 e IP-10 permiten distribuir a los pacientes en tres grupos con niveles de IP-10 menores a 570 pg/ml (nodo 5); entre 570 y

1243 pg/ml (nodo 6); y niveles superiores a 1.243 pg/ml (nodo 4). Así, niveles de IL-7 menores de 141 pg/ml (nodo 1) y niveles de IP-10 menores a 570 pg/ml (nodos 3 y 5) identifican un grupo de pacientes con el mayor riesgo de EMPP (OR=22; IC 95%: 2,65-481,68,  $p<0,001$ ) con un 73% de pacientes EMPP representados con estos valores. En este caso, el algoritmo muestra una sensibilidad del 73,3% y una especificidad del 85,3% para el diagnóstico de pacientes EMPP, con una capacidad de descartar la enfermedad (VPN) del 97,3%. Por otro lado, para valores de IL-7 menores de 141 pg/ml (nodo 1), la mayoría de pacientes con EMRR presentan niveles de IP-10 entre 1243 y 570 pg/ml (nodo 6), lo que supone una buena aproximación en la clasificación de estos pacientes (OR=3; IC 95%: 1,2-7,8,  $p=0,019$ ).

Para cada nodo se indican una serie de analitos “suplentes” (Tabla 15) que representan variables útiles para la discriminación en cada nodo del árbol cuando la determinación de IL-7 (para los nodos 1 y 2) o IP-10 (nodos 3-6) no está disponible. Estos “suplentes” están seleccionados en base a su capacidad de discriminar “EM” de “no EM”, y la asociación indica el grado de concordancia con IL-7 en la primera bifurcación e IP-10 en la segunda y tercera, y representa la capacidad de distribuir a los pacientes como lo hacen estos dos analitos.

Variables Suplentes		
Nodo parental	Analito	Asociación
0	VEGF	0,715
	IL-1ra	0,336
	Basic FGF	0,302
1	MIG	0,541
	HGF	0,342
	EGF	0,332
3	MIG	0,339
	IL-7	0,304
	EGF	0,157

**Tabla 144.** Listado de analitos “suplentes” para la discriminación entre EM y no EM (OEN) en cada una de las tres bifurcaciones de la Figura 28. La última columna muestra la asociación o concordancia con IL-7 (1ª bifurcación) e IP-10 (2ª y 3ª bifurcaciones) para distribuir los pacientes de la misma manera.



**Figura 28.** Árbol de decisión para predecir el riesgo de EM y cada una de sus formas clínicas (calculado en 89 pacientes con EM: 74 EM-RR y 15 EM-PP; y 96 con OEN).

		Odds ratio	Intervalo de confianza	p-valor
EM	IL-7 (1ª bifurcación)	6,5	3,1-14,0	<0,001
	IP-10 (2ª bifurcación)	5,6	2,1-15,1	<0,001
	IP-10 (3ª bifurcación)	2,5	0,8-8,2	0,138
EMRR	IL-7 (1ª bifurcación)	5,7	2,6-12,9	<0,001
	IP-10 (2ª bifurcación)	3,0	1,2-7,8	0,019
	IP-10 (3ª bifurcación)	0,6	0,2-1,6	0,272
EMPP	IL-7 (1ª bifurcación)	2,4	0,6-11,4	0,263
	IP-10 (2ª bifurcación)			0,035
	IP-10 (3ª bifurcación)	22	2,7-481,7	<0,001

**Tabla 15.** Se indican el Odds Ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% que determinan el riesgo de EM, EMRR o EMPP cuando se consideran únicamente valores de IL-7 menores a 141 pg/ml (1ª bifurcación), conjuntamente con valores de IP-10 menores de 1243 pg/ml (2ª bifurcación), o incluyendo valores de IP-10 menores a 570 pg/ml (3ª bifurcación).

## 4. Estudio en LCR

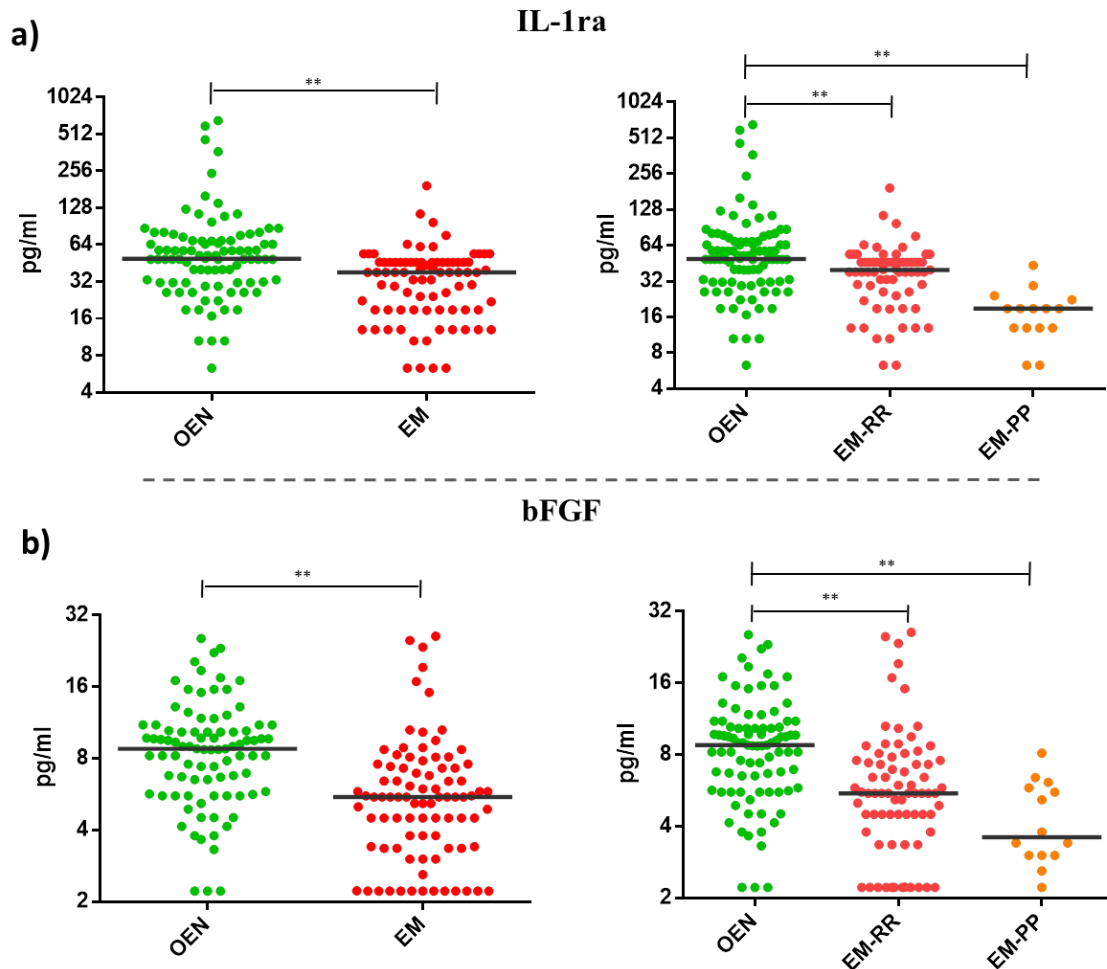
### 4.1. Evaluación de marcadores solubles

En concordancia con los resultados obtenidos en suero, IL-1ra, bFGF e IL-7 muestran el mismo perfil en LCR, con una disminución significativa en pacientes con EM. En el caso de IL-7, sigue observándose una disminución más marcada en pacientes con la forma EMRR. Además de estas diferencias, similares a las observadas en suero, se suman la disminución de otras tres quimiocinas, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , Mig y RANTES en el LCR de pacientes con EMRR.

#### 4.1.1. Disminución de IL-1ra y bFGF en LCR de pacientes con EM

Los niveles en LCR, similares a los observados en suero, muestran una disminución significativa en pacientes con EM estudiados conjuntamente (38,2 (18,8-46,1) pg/ml) comparado con OEN (48,9 (31,4-69,1) pg/ml) ( $p<0,001$ ), y al analizar ambos grupos clínicos independientemente: EMRR (39,8 (26,1-46,1) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$ ; EMPP (18,8 (13,0-22,4) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$ ; donde la forma progresiva sigue mostrando los niveles más bajos (Figura 29a).

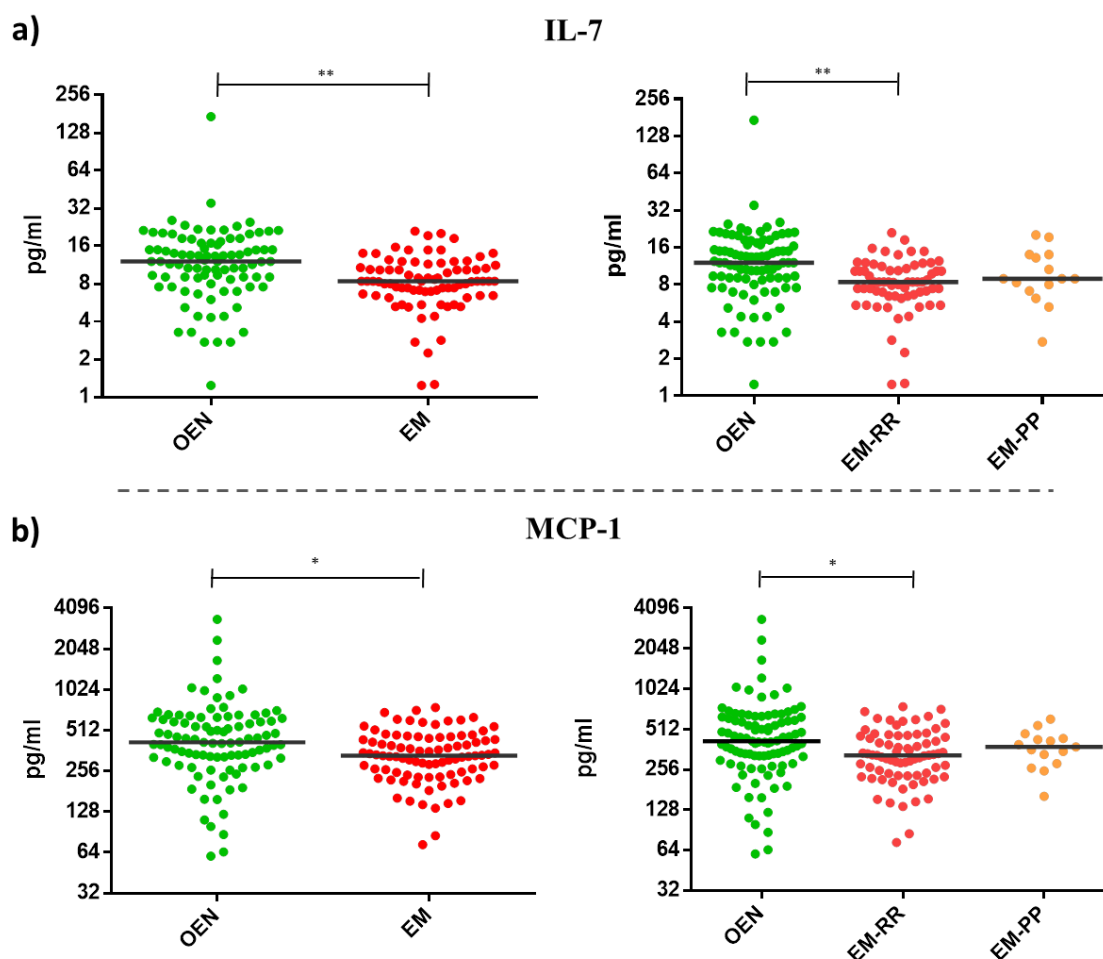
El mismo perfil se observa en los niveles de bFGF en LCR, significativamente disminuidos en EM (5,5 (3,4-7,5) pg/ml) respecto a OEN (8,8 (5,7-10,9) pg/ml) ( $p<0,001$ ) incluso analizando los pacientes por separado: EMRR (5,5 (4,3-7,6) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$ ; EMPP (3,6 (3,0-5,9) pg/ml) vs OEN,  $p<0,001$  (Figura 29b).



**Figura 29.** a) Comparación de los niveles de a) IL-1ra y b) bFGF en LCR entre los grupos de controles sanos, pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EM (EM-RR+EM-PP) tanto globalmente (izquierda) como subdivididos en EMRR y EMPP (derecha). \*\* $p < 0,001$ . Test de Mann-Whitney. Se representan los datos individuales y las medianas.

#### 4.1.2. Disminución específica de IL-7 en LCR de pacientes con EM: predominio en la forma EMRR

Al igual que en suero, los niveles de IL-7 en LCR se encuentran significativamente disminuidos en EM (8,4 (6,4-10,9) pg/ml) al comparar con controles OEN (12,1 (8,5-17,0) pg/ml) ( $p < 0,001$ ). Esta diferencia al analizar independientemente ambas formas clínicas de EM, parece debida a una mayor disminución en la forma más inflamatoria de la enfermedad: EMRR (8,4 (6,4-10,4) pg/ml) vs OEN,  $p < 0,001$ , que no es significativa en el caso de pacientes con la forma progresiva probablemente debido al tamaño muestral (Figura 30a).



**Figura 30.** a) Comparación de los niveles de a) IL-7 y b) MCP-1 en LCR entre los grupos de controles sanos, pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EM (EMRR+EMPP) tanto globalmente (izquierda) como subdivididos en EMRR y EMPP (derecha). \*\* $p < 0,001$ , \* $p = 0,001$ . Test de Mann-Whitney. Se representan los datos individuales y las medianas.

Estas diferencias en los niveles de IL-7 se mantienen con respecto a ambos grupos de controles neurológicos analizados independientemente (EMRR: 8,4 (6,4-10,4) pg/ml vs ENNI: 12,1 (8,9-16,8) pg/ml,  $p < 0,001$ ; EMRR vs ENI: 12,2 (7,4-18,2) pg/ml,  $p = 0,003$ ) (Figura 31a).

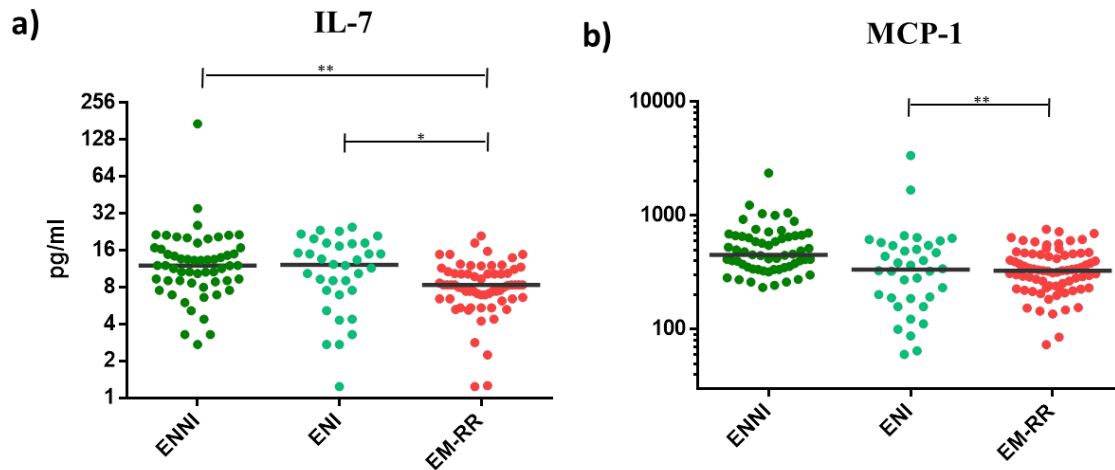
#### 4.1.3. Disminución inespecífica de MCP-1 en LCR de pacientes con EMRR

Un comportamiento similar al de IL-7 se observa en los niveles de MCP-1 en LCR, que se encuentran significativamente disminuidos en pacientes con EM (332,2 (248,0-447,9) pg/ml) con respecto a OEN (418,0 (322,7-628,7) pg/ml) ( $p = 0,001$ ). Al analizar independientemente ambas formas clínicas, estas diferencias se observan



únicamente entre la forma EM-RR (327,2 (231,5-455,3) pg/ml) y los controles OND ( $p=0,001$ ) (Figura 30b).

Sin embargo, los niveles de MCP-1 en la EMRR muestran diferencias únicamente al comparar con controles no inflamatorios: EMRR: 327,2 (231,5-455,3) pg/ml vs ENNI: 451,0 (347,7-664,0) pg/ml,  $p=0,001$  (Figura 31b).

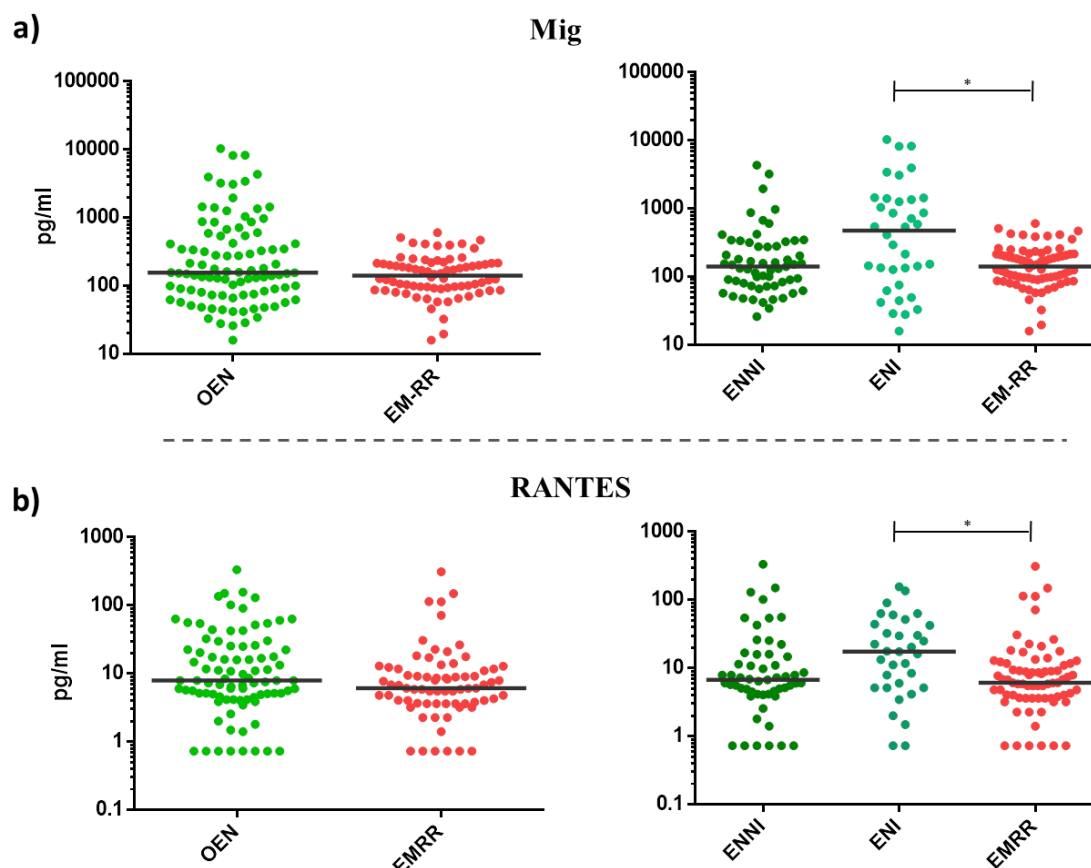


**Figura 3114.** Comparación de los niveles de a) IL-7 y b) MCP-1 en LCR entre los grupos de pacientes con otras enfermedades neurológicas subdivididos en ENNI y ENI, y pacientes con EMRR. \*\* $p<0,001$ , \* $p=0,003$ . Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.

#### 4.1.4. Disminución de Mig y RANTES en LCR de pacientes con EMRR

Los niveles de Mig en LCR también disminuyen en pacientes EMRR, aunque en este caso, esta diferencia es estadísticamente significativa sólo cuando se compara con el correspondiente grupo control de ENI: EMRR (140,6 (91,8-215,3) pg/ml) vs ENI (475,6 (88,6-1392,5) pg/ml) ( $p=0,005$ ) (Figura 32a).

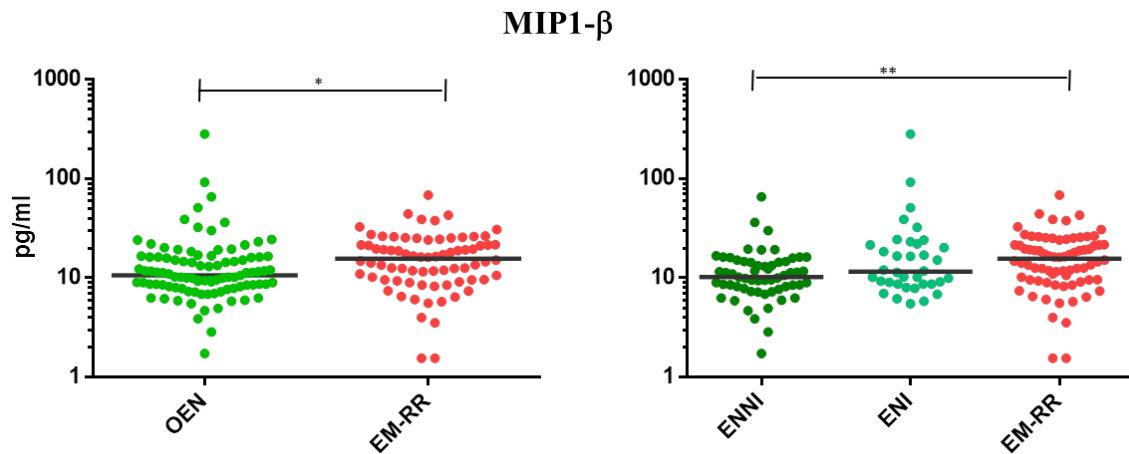
Lo mismo ocurre con los niveles de RANTES, donde se observa una disminución significativa de sus niveles en LCR de pacientes con EMRR (6,1 (3,7-11,7) pg/ml) únicamente al comparar con su correspondiente control inflamatorio (17,5 (5,1-43,3) pg/ml) ( $p=0,003$ ) (Figura 32b).



**Figura 32.** Comparación de los niveles de a) Mig y b) RANTES en LCR entre los grupos de pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EMRR (izquierda) y subdivididos en ENNI y ENI (derecha). a)  $*p=0,005$ ; b)  $*p=0,003$ . Test de Mann-Whitney. Se representan los datos individuales y las medianas.

#### 4.1.5. Aumento inespecífico de MIP-1 $\beta$ en LCR de pacientes con EMRR

En el caso de MIP-1 $\beta$ , los niveles en LCR se encuentran significativamente elevados únicamente en EMRR (15,7 (9,6-22,3) pg/ml) comparando con OEN (10,6 (8,21-16,3) pg/ml ( $p=0,003$ ). Estas diferencias son significativas únicamente al comparar con controles no inflamatorios: EMRR vs ENNI: 10,2 (7,9-14,6) pg/ml,  $p<0,001$  (Figura 33).

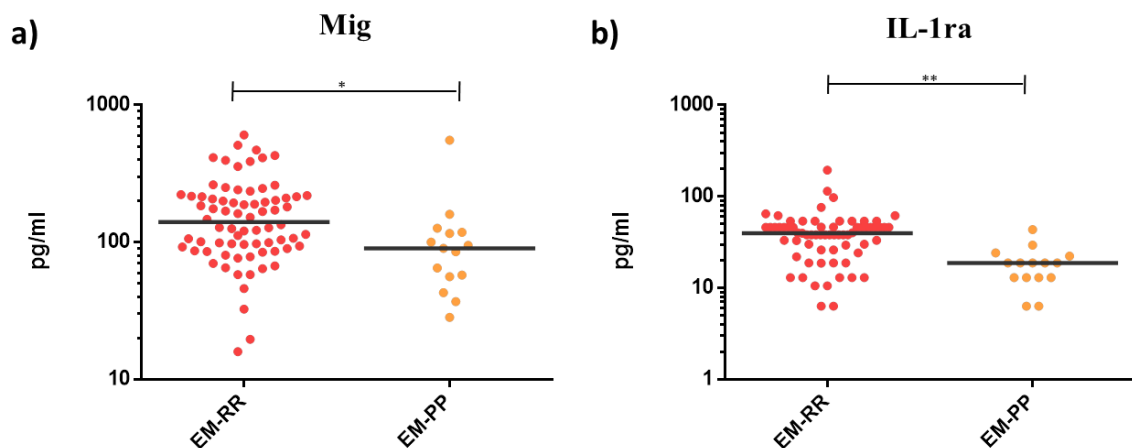


**Figura 33.** Comparación de los niveles de MIP-1β en LCR entre los grupos de pacientes con otras enfermedades neurológicas (ENNI+ENI) y pacientes con EMRR (izquierda) y subdivididos en ENNI y ENI (derecha). \* $p=0,003$ . Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.

#### 4.1.6. Disminución de Mig e IL-1ra en la forma primaria progresiva de EM: valor pronóstico

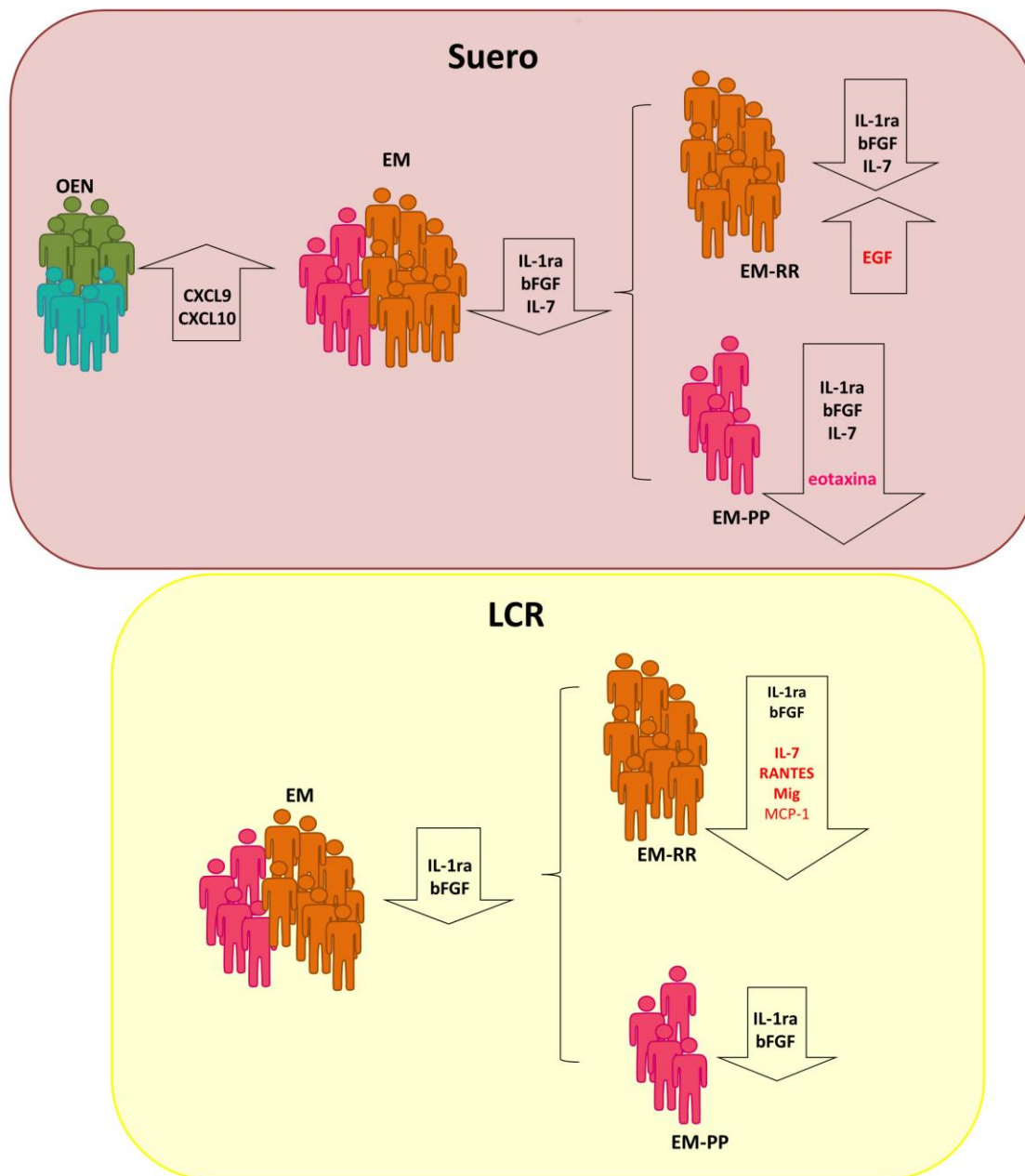
Al igual que se observa en suero, los niveles de Mig en LCR muestran marcadas diferencias entre las formas EMRR (140,6 (91,8-215,3) pg/ml) y EMPP (90,5 (56,1-118,2) pg/ml) ( $p=0,006$ ) (Figura 34a).

Por otro lado, IL-1ra en LCR, además de mostrar diferencias significativas en sus niveles entre EM y OEN, se encuentra disminuido significativamente en las formas progresivas: EMRR (39,8 (26,1-46,1) pg/ml vs EMPP: 18,8 (13,0-22,4) pg/ml,  $p<0,001$  (Figura 34b).



**Figura 3415.** Comparación de los niveles de a) Mig y b) IL-1ra en LCR entre los grupos de pacientes con EMRR y EMPP. \*\* $p<0,001$ ; \* $p=0,006$ . Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.

La Figura 35 muestra una representación esquemática de los resultados obtenidos en el análisis de los 9 biomarcadores estudiados en el análisis bivalente (test Mann-Whitney) en suero y LCR. Se muestran los resultados globales en pacientes con EM y desglosados en cada una de las formas clínicas, respecto a individuos con OEN y CS.



**Figura 35.** Representación esquemática de los cambios observados en suero y LCR de pacientes EM de los diferentes analitos estudiados. En naranja se muestran los analitos que sólo muestran diferencias en la forma EMRR respecto a controles, y en rosa las diferencias observadas solamente en EMPP.

#### 4.1.7. Expresión intratecal y correlación con la discapacidad

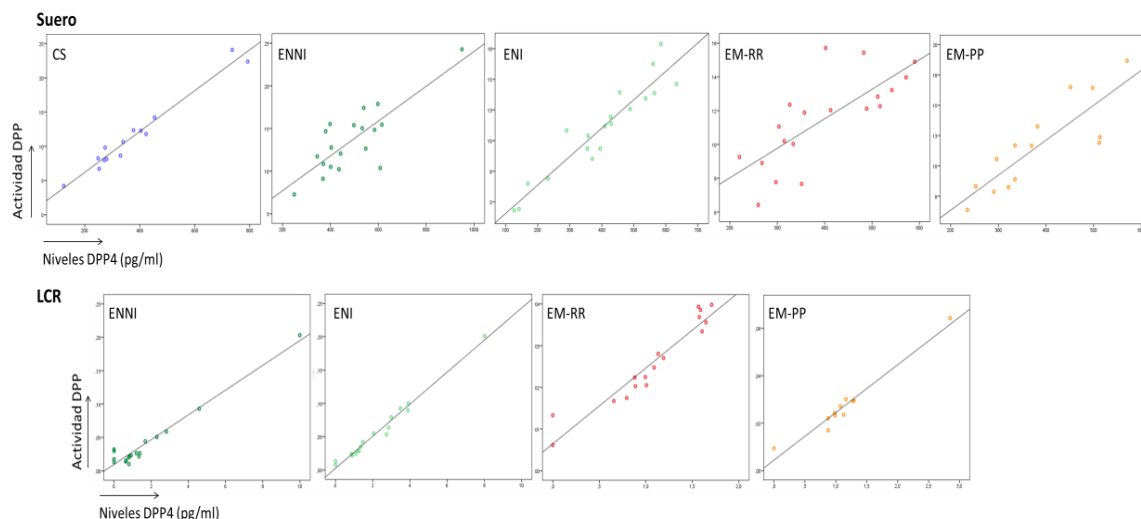
El análisis comparativo de los niveles en LCR y suero mediante el cociente LCR/suero, indica que, excepto para MCP-1 e IP-10 que parecen tener una mayor expresión intratecal, el resto de analitos presenta una concentración menor entre 2 y 20 veces en LCR que en suero. En el caso de IP-10 y MCP-1, los niveles en LCR alcanzan niveles de entre 1,5 y 3 veces superiores a los observados en suero respectivamente, siendo máximo este cociente en pacientes con la forma progresiva de EM (1,8 y 4,2 respectivamente). Por otra parte, la correlación de los niveles de estos analitos en LCR con la discapacidad (medida mediante escala EDSS), muestra que IP-10 y MCP-1 correlacionan positivamente, con este índice (MCP-1:  $r_s=0,3324$ ,  $p=0,009$ ; IP10:  $r_s=0,3001$ ,  $p=0,019$ ). Existe también una correlación con el EDSS, en este caso negativa, para los analitos MIP-1 $\beta$ , bFGF, IL-1ra, eotaxina y Mig: MIP-1 $\beta$  ( $r_s=-0,270$ ,  $p=0,034$ ); bFGF ( $r_s=-0,265$ ,  $p=0,039$ ); IL-1ra ( $r_s=-0,453$ ,  $p<0,001$ ), eotaxina ( $r_s=-0,351$ ,  $p=0,009$ ), Mig ( $r_s=-0,299$ ,  $p=0,02$ ). La correlación más importante es con IL-1ra.

## 5. Estudio de DPP e isoformas de IP-10

### 5.1. DPP4 soluble y actividad DPP: disminución de la actividad DPP en LCR de pacientes con EM

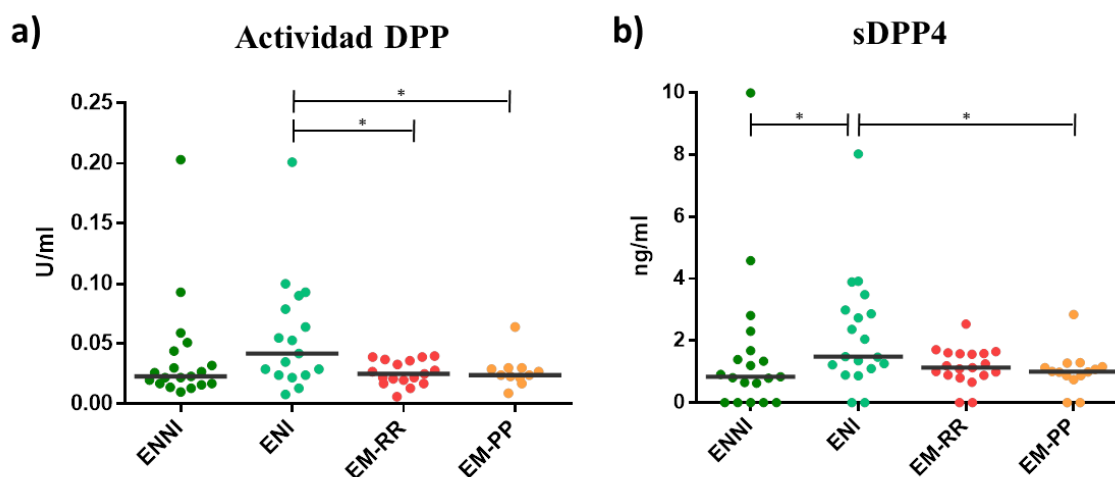
Se evaluaron los niveles de DPP4 solubles y la actividad DPP en el suero y LCR de 20 individuos representativos de cada uno de los cinco grupos de estudio.

En primer lugar, se observó una correlación entre los niveles de DPP4 soluble y la actividad funcional de DPP en todos los grupos (Figura 36) tanto en suero (CS:  $r=0,93$ ,  $p<0,001$ ; ENNI:  $r=0,60$ ,  $p=0,007$ ; ENI:  $r=0,95$ ,  $p<0,001$ ; EMRR:  $r=0,78$ ,  $p<0,001$ ; EMPP:  $r=0,89$ ,  $p<0,001$ ), como en LCR (ENNI:  $r=0,69$ ,  $p=0,001$ ; ENI:  $r=0,99$ ,  $p<0,001$ ; EMRR:  $r=0,94$ ,  $p<0,001$ ; EMPP:  $r=0,94$ ,  $p<0,001$ ).



**Figura 36.** Correlación entre la actividad DPP (U/ml) (eje Y) y los niveles de DPP4 (pg/ml) (eje X) en suero (arriba) y LCR (abajo) de los diferentes grupos de estudio. Se representa en cada uno de los casos la línea de mínimos cuadrados.

Lo más llamativo fueron las diferencias observadas en la actividad de la enzima en LCR, con una disminución en la actividad de ambas formas clínicas de EM respecto al grupo control de ENI, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa tras aplicar el test de Bonferroni probablemente debido al tamaño muestral (EMRR vs ENI:  $p=0,03$ ; EMPP vs ENI:  $p=0,04$ ) (Figura 37a).



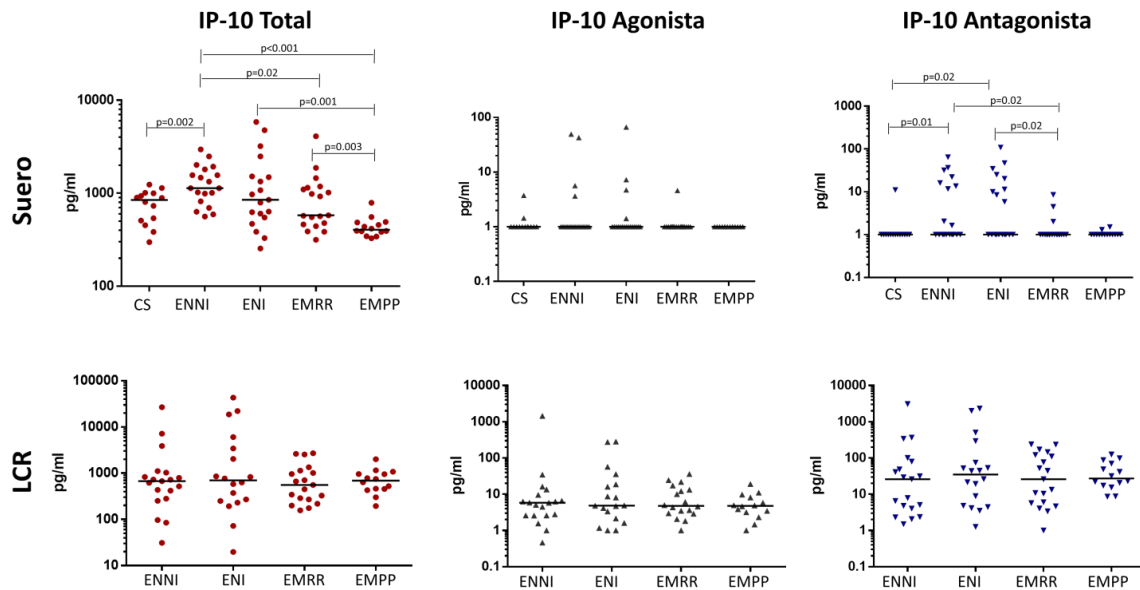
**Figura 37.** a) Actividad de DPP en LCR medida en U/ml y b) niveles de DPP4 solubles (ng/ml) en LCR, en los cuatro grupos de estudio analizados. Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.

En cuanto a los niveles de la forma soluble de la enzima, únicamente se observan diferencias en LCR en la forma progresiva de EM al comparar con pacientes con ENI ( $p=0,007$ ) (Figura 37b). En suero no existen diferencias significativas, aunque se observa una disminución en pacientes con EM (EMRR vs ENI:  $p=0,04$ ; EMPP vs ENNI:  $p=0,013$ ).

## 5.2. Niveles de las formas agonista y antagonista de IP-10

Ambas isoformas de IP-10, agonista (nativa) y antagonista (truncada por DPP4) se analizaron en los mismos 20 individuos de cada grupo estudiados en los ensayos de DPP. La mayoría de muestras presentaron niveles indetectables de la forma agonista de IP-10, tanto en suero como en LCR. Lo más destacable es el aumento de la forma antagonista en suero de ambos controles neurológicos (ENI y ENNI) respecto a individuos con EM, y que no correlacionan con la actividad DPP.

Al realizar una medida relativa de la forma antagonista de IP-10 respecto al total ((total-agonista)/total) se observa una ligera disminución de la isoforma truncada en el grupo de EMPP, pero en ningún caso puede considerarse significativa (Figura 38).



**Figura 38.** Niveles de IP-10 total, y formas agonista y antagonista en suero y LCR en cada uno de los grupos de estudio. Test de Mann-Withney. Se representan los datos individuales y las medianas.

---

# **EVALUACIÓN FUNCIONAL**

## **DE LA VÍA DEL IFN-TIPO I**



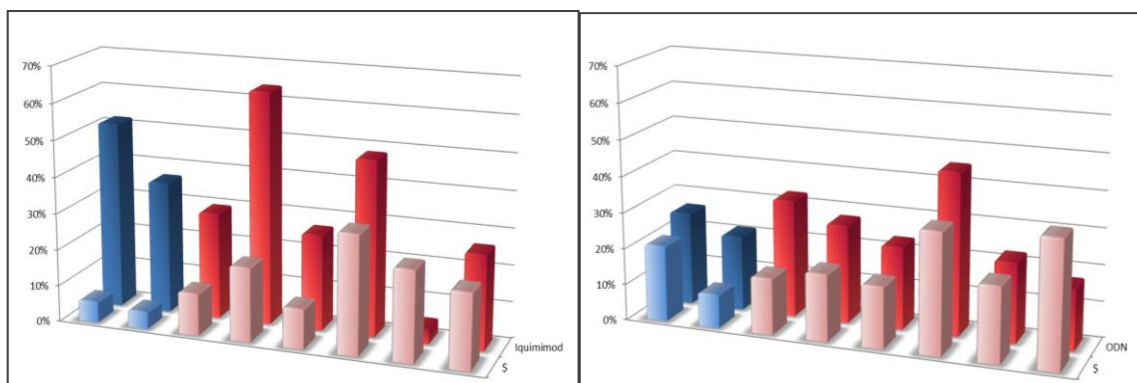
## 1. Análisis de expresión de TLR en PBMCs

Se evaluó la respuesta a la estimulación con péptidos virales naturales o sintéticos en PBMCs de pacientes con EM y CS. Para ello se estudió el aumento en la expresión de los TLR de respuesta viral (TLRs 3, 7 y 9) en estas células mediante citometría de flujo y RT-PCR.

### 1.1. Estudios de expresión de TLR y proliferación por citometría de flujo

Se evaluó la expresión de TLR en CD4 y monocitos (TLRs 3, 7 y 9), y en linfocitos B (TLRs 7 y 9), en un total de 8 pacientes EM-RR y 4 CS en respuesta a los estímulos indicados en la Tabla 6.

El estudio en linfocitos B muestra un aumento en la expresión de los TLRs 7 y 9 tras su estimulación con sus correspondientes estímulos sintéticos (Figura 39). Destaca que, en el caso de expresión de TLR7, los pacientes con EM mostraron expresión basal elevada pero que, tras estimulación con agonistas de TLR7 (imiquimod), el aumento proporcional es menor que en los CS, donde su expresión es 8,3 veces mayor, respecto a la de pacientes con EM, que tiene un aumento medio de 1,3 veces tras la estimulación.

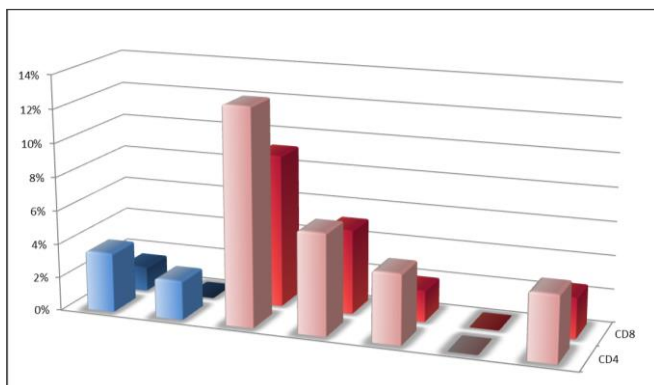


**Figura 39.** Expresión de TLR7 (izquierda) y TLR9 (derecha) en LB sin estimular (\$) y tras la estimulación con Iquimimod (3 µg/mL) y ODN (0,5 µg/mL) respectivamente. Se muestra el porcentaje de expresión de TLR sobre el total de LB en CS (azul) y pacientes con EM-RR (rojo).

En el caso de expresión de TLR9 en linfocitos B, el incremento en la expresión tras la estimulación, es similar entre CS y enfermos (aumento de 1,7 veces frente a 1,2).

El análisis de expresión en monocitos muestra una elevada expresión de los 3 TLR estudiados en todos los individuos, sin mostrar diferencias en la respuesta entre enfermos y controles.

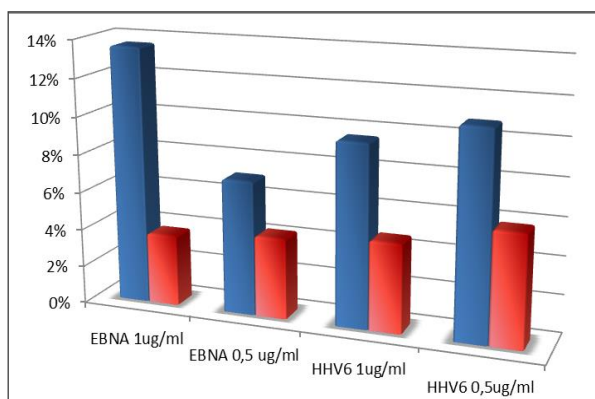
Cuando se analizó la capacidad de proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (con CFSE) tras seis días de estimulación, se observa que, en concordancia con la mayor expresión basal de TLR en pacientes EM, hay un mayor porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en estos pacientes en ausencia de estímulo, sobre todo de células CD8<sup>+</sup> (Figura 40). El aumento en la proliferación de estas células tras el estímulo, es similar tanto en CS como en enfermos para ambos tipos celulares.



**Figura 40.** Porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en CS (azul) y pacientes con EMRR (rojo) tras 6 días de cultivo en ausencia de estímulo. Los resultados se expresan en porcentaje y evalúan el aumento de la señal de CFSE observado por citometría de flujo.

Destaca la disminución de linfocitos T<sub>Reg</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>) en pacientes con EM, tras la estimulación con EBNA-1 y VHH-6 (Figura 41).

**Figura 41.** Estudio de la proliferación de linfocitos T<sub>Reg</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) en CS (azul) y pacientes EM-RR (rojo) tras estimulación con péptidos de los virus VEB (EBNA 1μg/mL y 0,5μg/mL) y el virus VHH tipo 6 (VHH-6 1μg/mL y 0,5μg/mL). Los resultados se expresan en porcentaje y evalúan el aumento de la señal de CFSE observado por citometría de flujo.

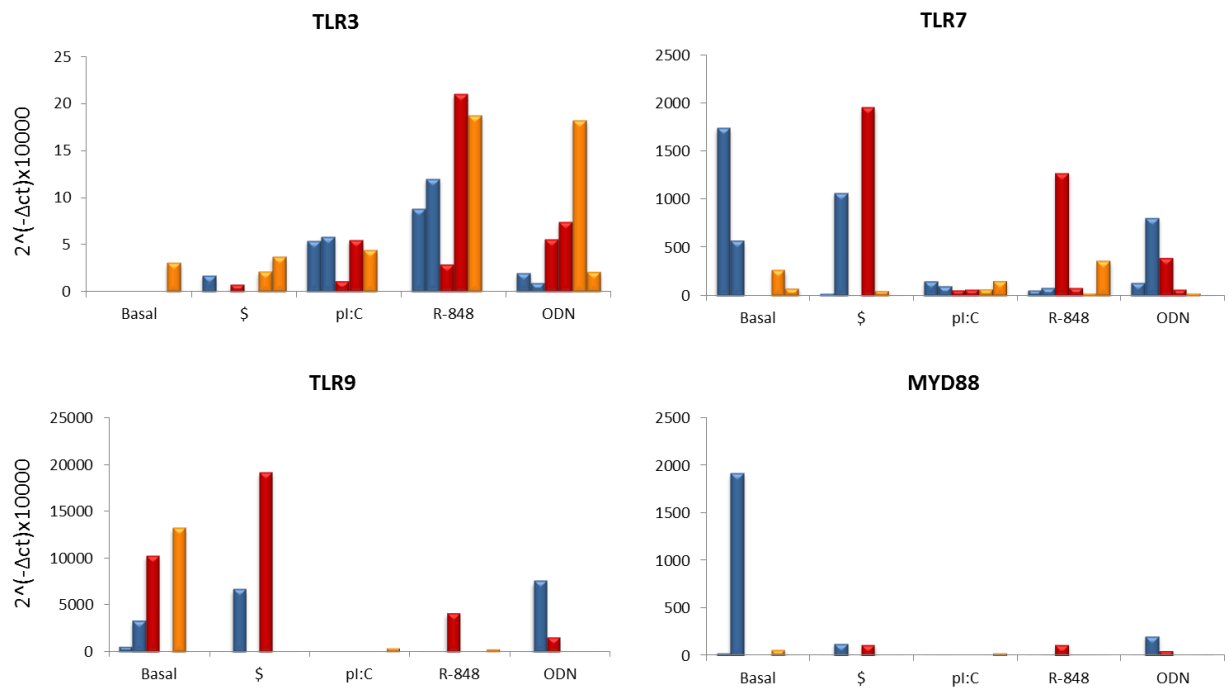


## 1.2. Estudio de expresión de TLR por RT-PCR

Se evaluó la expresión de los genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR9* y *MYD88* en un total de 4 pacientes (2 EMRR y 2 EMPP) y 2 CS. Para ello se determinó la cantidad relativa de ARNm de estos genes en cada uno de los individuos (Tabla 16).

Los resultados de la expresión génica en este caso muestran una distribución muy heterogénea para cada uno de los genes analizados. Incluso en CS, se observa una gran

variabilidad en la expresión de los 4 genes analizados que impide poder analizar correctamente estos resultados (Figura 42).



**Figura 42.** Expresión de los genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR9* y *MYD88* normalizados frente al gen EF1A en CS (azul), pacientes EMRR (rojo) y pacientes EMPP (naranja). Se muestran los niveles de ARNm representados como  $2^{(-\Delta Ct)} \times 1000$ .

		TLR3		TLR7		TLR9		MyD88	
		$\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct} \times 10000$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct} \times 10000$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct} \times 10000$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct} \times 10000$
Basal	C1			2,5188	1744,9311	4,2595	522,1228	8,6748	24,4697
	C2			4,1304	570,9836	1,5934	3313,9012	2,3800	1921,1026
	P1(EMRR)					-0,0370	10260,1228		
	P2(EMRR)								
	P3(EMPP)			5,2630	260,4301	-0,4049	13239,6869	7,4486	57,2456
	P4(EMPP)	11,6998	3,0062	7,0381	76,0903	10,4441	7,1782	11,1073	4,5328
\$	C1	12,5511	1,6663	8,8985	20,9541	9,3165	15,6834	12,1048	2,2704
	C2			3,2310	1065,0300	0,5858	6663,0009	6,3028	126,6666
	P1(EMRR)	13,8112	0,6957	10,2671	8,1149	10,6573	6,1920	10,5366	6,7322
	P2(EMRR)			2,3517	1959,1055	-0,9378	19156,3075	6,4991	110,5582
	P3(EMPP)	12,2144	2,1043	7,6630	49,3422	9,8373	10,9312	11,1837	4,2990
	P4(EMPP)	11,4163	3,6588	10,4954	6,9275	10,2087	8,4502	11,2892	3,9960
Poly I:C	C1	10,8466	5,4306	6,0220	153,8848	10,0534	9,4108	11,2603	4,0768
	C2	10,7373	5,8582	6,5883	103,9225	8,6474	24,9384	10,0484	9,4432
	P1(EMRR)	13,2138	1,0526	7,5352	53,9098	9,5635	13,2159	10,8006	5,6066
	P2(EMRR)	10,8350	5,4746	7,2858	64,0837	9,4053	14,7475	10,3656	7,5797
	P3(EMPP)	11,1284	4,4670	7,3171	62,7083	9,6388	12,5443	10,1478	8,8147
	P4(EMPP)			6,0281	153,2380	5,0367	304,6440	8,8240	22,0649
R-848	C1	10,1519	8,7896	7,5262	54,2496	10,8656	5,3594	10,1746	8,6524
	C2	9,7013	12,0123	6,9903	78,6501	11,0435	4,7378	9,3293	15,5458
	P1(EMRR)	11,7574	2,8885	2,9797	1267,6897	1,2765	4127,9775	6,5518	106,5878
	P2(EMRR)	8,8945	21,0135	6,9760	79,4360	12,2747	2,0181	9,1865	17,1633
	P3(EMPP)	9,0611	18,7214	8,5886	25,9759	12,3051	1,9761	9,5398	13,4353
	P4(EMPP)			4,8093	356,6530	5,2924	255,1613	10,0401	9,4976
ODN	C1	12,3369	1,9329	6,1719	138,7005	6,5593	106,0361	11,3212	3,9083
	C2	13,4640	0,8850	3,6359	804,4095	0,4045	7554,7740	5,6136	204,2347
	P1(EMRR)	10,8238	5,5169	4,6858	388,5500	2,6994	1539,5291	7,6391	50,1658
	P2(EMRR)	10,3997	7,4027	7,1608	69,8852	8,7754	22,8216	10,2863	8,0077
	P3(EMPP)	9,1027	18,1897	9,0183	19,2852	8,2396	33,0857	11,6443	3,1240
	P4(EMPP)	12,2741	2,0190	10,1888	8,5679	10,4489	7,1543	9,4270	14,5276

**Tabla 16.** Datos de expresión relativa de los genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR9* y *MYD88* por PCR cuantitativa expresados como  $\Delta Ct$  y  $2^{-\Delta Ct} \times 10000$ .

## 2. Análisis de expresión de los productos de la vía de señalización

### 2.1. Estudio de producción de IFN- $\alpha$ y TNF- $\alpha$ en CD<sub>s</sub>

Para evaluar la respuesta de CD<sub>s</sub> de pacientes con EM tras la estimulación con los péptidos virales del VEB (EBNA-1) y el VHH-6 (serotipo B), se evaluó la producción de IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , productos resultantes de la señalización por TLR. El estudio, realizado por citometría, analiza la producción de estas dos proteínas en CD<sub>m</sub>, que expresan mayoritariamente TLR3, y CD<sub>p</sub> que tienen una mayor expresión de los TLRs 7 y 9.

No se observan grandes diferencias en función del estímulo viral empleado. Se observa una ausencia de respuesta frente a los estímulos virales en pacientes con EM, respecto a CS, los cuales muestran un aumento en la producción de IFN- $\alpha$  de 1,8 veces en el caso de CD<sub>m</sub>, y 1,2 en CD<sub>p</sub> comparado a células cultivadas en ausencia de estímulo.

	\$	EBNA-1 1ug/ml	EBNA-1 0,5 ug/ml	VHH-6 1ug/ml	VHH-6 0,5ug/ml	
<b>Control</b>	34,8	53,2	65,8	58,8	64,7	CD <sub>m</sub>
	6,5	7,2	16,5	10,2	8,2	CD <sub>s</sub>
<b>Control</b>	31,0	54,9	63,0	60,1	54,4	CD <sub>m</sub>
	31,2	35,5	28,4	37,1	33,2	CD <sub>p</sub>
<b>Paciente</b>	44,6	47,4	54,0	41,5	17,4	CD <sub>m</sub>
	51,8	53,1	13,9	49,5	24,4	CD <sub>p</sub>

**Tabla 17.** Producción de IFN- $\alpha$  en células dendríticas mieloides (CD<sub>m</sub>) y plasmacitoides (CD<sub>p</sub>) tras la estimulación con los péptidos virales EBNA-1 y VHH-6.

Al igual que ocurre con la expresión de los TLR en ausencia de estímulo, la producción de IFN- $\alpha$  es mayor en pacientes con EMRR en estado basal sin estimular (44,6% y 51,8%), comparado al grupo de CS (Tabla 17).

### 2.2. Estudio de producción de IFN- $\beta$ en fibroblastos

Paralelamente a los estudios en PBMCs, se evaluó la respuesta a la señalización por PRRs en fibroblastos en individuos sanos, y pacientes con EM (EMRR y EMPP). Para ello se realizó un cultivo durante 24 horas con varios estímulos de estas vías (Tabla 9) y se determinó la producción de IFN- $\beta$  por estas células.

Se observa una marcada disminución en la producción de IFN- $\beta$  por los fibroblastos del paciente con EMRR (4,3 pg/ml) tras la estimulación con el agonista sintético de

TLR3 poly I:C (pIC) respecto a CS y EMPP, que muestran una producción similar (127,2; 151,8 pg/ml respectivamente) (Tabla 18).

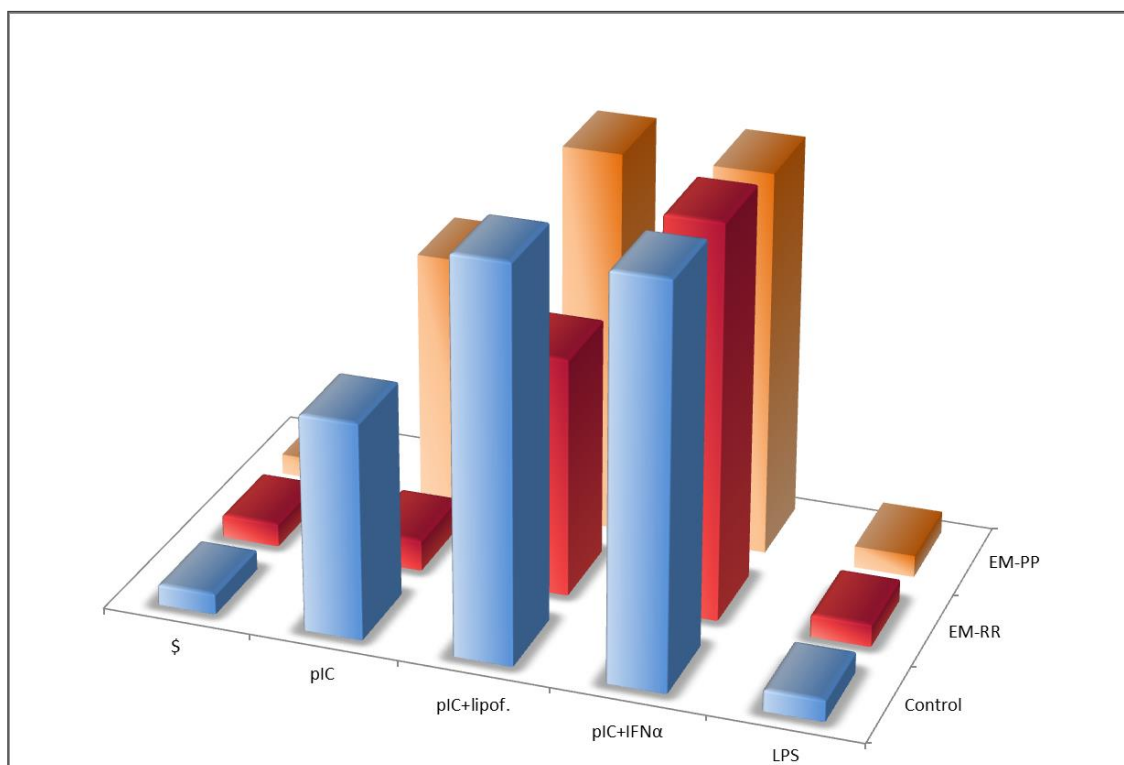
El estímulo pIC se incorporó en el cultivo de tres maneras diferentes: de manera aislada, junto con lipofectamina, y tras una incubación previa con IFN- $\alpha$ . Los resultados de la condición aislada son los mencionados previamente. En el caso de la incubación con lipofectamina, se busca introducir el estímulo directamente en la célula, evitando la vía endosómica y estimulando así únicamente los receptores citosólicos MDA-5 y RIG-I, de funciones similares a los TLR. Bajo esta condición, se observa un incremento significativo en la producción de IFN- $\beta$  por parte de los fibroblastos de EMRR con respecto al estímulo con sólo pIC, aunque sigue estando muy por debajo de la producción tanto en el CS como en el paciente con EMPP (Figura 43).

	Control		EM-RR		EM-PP	
	IFN- $\beta$ (pg/ml)	D.O. (450nm)	IFN- $\beta$ (pg/ml)	D.O. (450nm)	IFN- $\beta$ (pg/ml)	D.O. (450nm)
\$	0	0,226	0	0,256	0	0,228
pIC	127,2	2,383	4,3	0,341	151,8	2,791
pIC+lipof.	>150	4,325	141,9	2,627	>150	4,213
pIC+IFN $\alpha$	>150	4,388	>150	4,327	>150	4,223
LPS	0	0,234	0	0,247	0	0,241

**Tabla 18.** Producción de IFN- $\beta$  (pg/ml) y medida de densidad óptica (D.O. a 450 nm) en el cultivo de fibroblastos tras la estimulación con poly I:C (pIC), poly I:C con lipofectamina (pIC+lipof.), poly I:C previamente incubado con IFN- $\alpha$  (pIC+IFN- $\alpha$ ) y lipopolisacárido (LPS).

En tercer lugar, la estimulación con pIC tras 24 horas de incubación con IFN- $\alpha$ , produce un incremento de la capacidad de producir IFN- $\beta$  por los fibroblastos de EMRR, alcanzando niveles comparables a los de los otros individuos estudiados.

El estímulo con LPS muestra ausencia de producción de IFN- $\beta$  en todos los pacientes.



**Figura 43.** Representación de la D.O. medida a 450 nm para evaluar la producción de IFN- $\beta$  en fibroblastos de CS (azul), EMRR (rojo) y EMPP (naranja).

---

# **ESCLEROSIS**

# **MÚLTIPLE FAMILIAR**



A través del estudio del exoma, se determinó el número de variantes (SNPs) presentes en cuatro casos de EM familiar (familia EM-1) de entre los ya descritos en los estudios de asociación de EM (69), o en desequilibrio de ligamiento con ellos. Se seleccionaron y estudiaron 9 SNPs en un total de 7 pacientes (4 de la familia EM-1 y 3 de la familia EM-2) y 12 familiares sanos (4 de la familia EM-1 y 8 de la familia EM-2). En todos ellos se determinó el GRS de los 9 SNPs finalmente estudiados.

## **1. Análisis de polimorfismos de base única en dos familias con EM**

### **1.1. Selección SNPs de estudio**

Partimos de un total de 159.768 variantes encontradas en el paciente 1, 155.185 variantes en el paciente 2, 151.335 variantes en el paciente 3 y 153.603 en el paciente 4. De todas estas variantes 68.489 son comunes a los cuatro pacientes señalados. A partir de este filtrado comenzamos a estudiar los SNPs asociados

Para el estudio de SNP y del GRS asociado a ellos, se seleccionaron aquellos SNPs presentes en las cuatro pacientes que ya estaban descritos en la literatura asociados a EM (69) o que estaban en desequilibrio de ligamiento (LD) con estos, con un valor de  $r \geq 0,8$ . Con esta estrategia, se seleccionaron 10 SNPs, dos de ellos ya descritos: rs41286801 y rs2293152, y los otros 8 en desequilibrio de ligamiento (Tabla 19). Finalmente, aunque en inicio se seleccionaron 10 SNPs, sólo se obtuvo resultado de 9 de ellos, por un problema en la fabricación de las sondas para la secuenciación.

### **1.2. Secuenciación SNPs**

Los SNPs previamente seleccionados se analizaron por secuenciación en ambas familias (EM-1 y EM-2), con muestras de 4 pacientes y 4 sanos en la primera familia (EM-1), y en la segunda (EM-2). El resultado de la secuenciación de los 9 SNPs se resume en la Tabla 20. Se incluyen los valores de uGRS y wGRS.

Gen	SNP GWAS	SNP exoma	r <sup>2</sup>	D'
MMEL1	rs4648356*	rs4648658/rs2260976/rs2843401	0,97/0,9/0,9	1/1/1
	rs3748817	rs4648658/rs2260976/rs2843401	0,92/0,95/0,95	0,97/1/1
DDAH1	rs11587876*	rs233111	0,8	1
EVI5,	rs11810217*	rs11808092	0,97	1
RPL5	rs41286801*	<b>rs41286801</b>	1	
CD58	rs2300747*	rs10802190	0,96	1
	rs1335532		0,93	1
RGS1	rs2760524	rs7535818	0,86	0,93
	rs1323292*		0,93	1
	rs1359062		0,93	1
NDFIP1	rs1062158*	rs7733850	1	1
		rs449454	0,98	1
RGS14	rs4075958*	rs11741640	1	1
		rs56235845	0,83	1
		rs56235845	0,81	0,92
		rs4075959	0,84	1
STAT3	rs2293152*	<b>rs2293152</b>	1	
CD40	rs6074022	rs1883832	0,97	1
	rs4810485**		1	1

**Tabla 19.** Resultados del estudio de desequilibrio de ligamiento entre SNPs dentro de cada gen. El desequilibrio de ligamiento entre pares de SNPs se muestra como r<sup>2</sup> (r<sup>2</sup>>0,8) y D'. \*SNPs seleccionados para el estudio en las dos familias EM. \*\*SNP excluido del análisis.

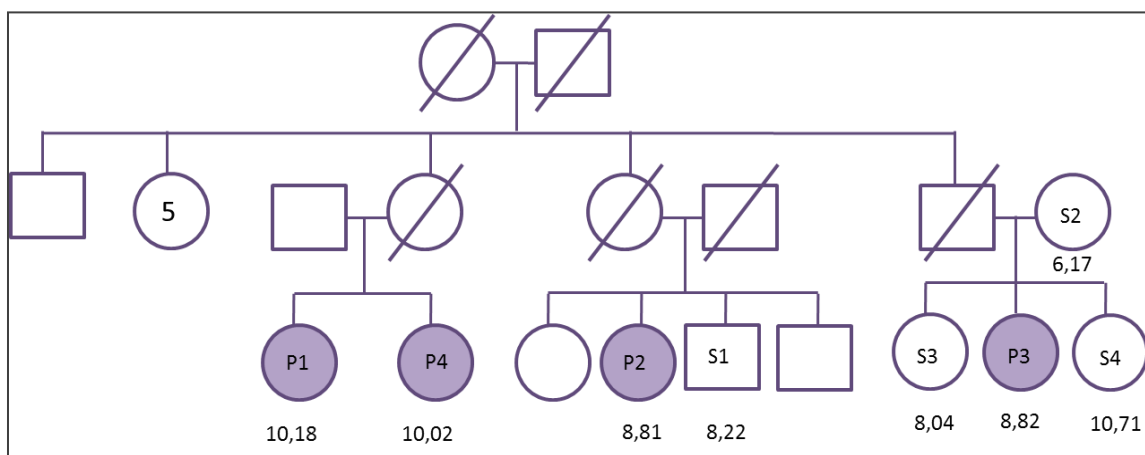
			rs4648356	rs11810217	rs41286801	rs2300747	rs1323292	rs1062158	rs4075958	rs4976646	rs2293152	GRS	
Gen			<i>MMEL1</i>	<i>EVI5, RPL5</i>		<i>CD58</i>	<i>RGS1</i>	<i>NDFIP1</i>	<i>RGS14</i>		<i>STAT3</i>		
Localización			Intergénica	Intrónica	3'UTR	Intrónica	Intergénica	Intrónica	Intergénica	Intrónica	Intrónica	uGRS	wGRS
Alelo minoritario			A	T	T	G	C	T	A	T	C		
O.R.			1,16	1,15	1,19	1,3	1,12	1,08	1,09	1,12	1,22		
EM-1	P1	EM-RR	C/A	C/T	C/T	A/G	T	C/T	A	C/T	C	10	10,18
	P2	EM-SP	C/A	C/T	C/T	A/G	T	C/T	A	C/T	G/C	9	8,81
	P3	EM-RR	C	C/T	C/T	G	T	C/T	A	C	G/C	8	8,82
	P4	EM-SP	C/A	C/T	C/T	G	T	C/T	G/A	C/T	G/C	9	10,02
	S1		C/A	C/T	C/T	A/G	T	C/T	G/A	C/T	G/C	8	8,22
	S2		C	C	C	A/G	T/C	T	A	C	G/C	7	6,17
	S3		C/A	C/T	C/T	A/G	T	C/T	A	C	G/C	8	8,04
	S4		C	C/T	C/T	G	T	T	A	C	C	10	10,71
EM-2	P5	EM-RR	C	C	C	A	T	C/T	G	C/T	G/C	3	2,67
	P6	EM-RR	C/A	C/T	C	A	T	C/T	G	T	C	7	6,78
	P7	EM-RR	C	C	C	A	T	T	G	C/T	G	3	1,83
	S5		C	C	C	A	T	C/T	G	C/T	C	4	4,03
	S6		C/A	C	C	A/G	T	C/T	G/A	C/T	G/C	6	6,07
	S7		C	C/T	C	A	T	C/T	G	C/T	G/C	4	3,62
	S8		C/A	C	C	A	T	C/T	G	C/T	G/C	4	3,68
	S9		C	C	C	A	T	C/T	G	C/T	G/C	3	2,67
	S10		C	C/T	C	A	T	T	G/A	C	G/C	5	3,97
	S11		C	C	C	A	T	C/T	G	C/T	G/C	3	2,67
	S12		C/A	C	C	A	T	C/T	G	T	G	4	3,10

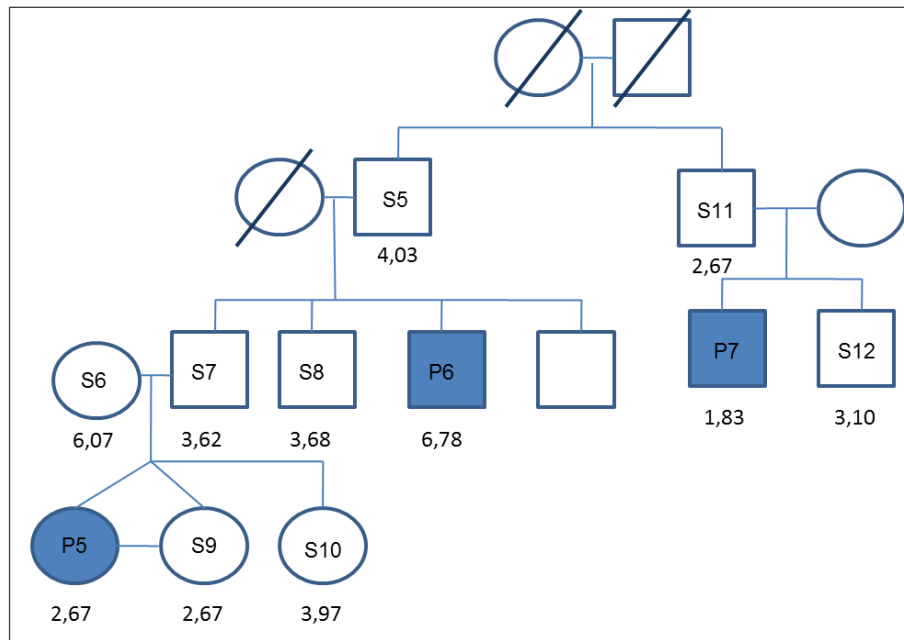
**Tabla 20.** Resultados de secuenciación y el GRS de los 9 SNPs estudiados en los 7 pacientes con EM (P) y 12 individuos sanos (S) en total, de dos familias con EM (EM-1 y EM-2).

Como se observa en la Tabla 20, los valores entre uGRS y wGRS varían, aunque en bajo grado ya que el riesgo asociado a cada SNP (OR) es igual o inferior a 1,3 en todos los casos. Aun así, elegimos el wGRS por, además de ser un modelo aditivo, considerar el riesgo asociado a cada una de estas variantes de susceptibilidad, en ausencia de interacciones entre ellas.

Se encontró una distribución muy heterogénea de los alelos de riesgo, observándose en muchos de los casos un mayor valor de GRS en parientes sanos que en enfermos. Es el caso de S2 (madre), P3, S3 y S4 (hijas), donde S4 presenta el mayor valor de wGRS (10,71) de todos los individuos estudiados de esa familia, incluyendo sanos y enfermos. Esta misma familia tiene dos hermanos, P2 y S1, con valores de wGRS similares (8,81 y 8,22 respectivamente). Lo mismo ocurre en la familia EM-2, donde el individuo S6, madre de paciente con EM no emparentada con el resto de familia EM, presenta un wGRS mayor al de su hija afectada (6,07 y 2,67 respectivamente), y es el mayor de todos los individuos sanos de esa familia (6,07). Por su parte, P7 tiene el valor de wGRS más bajo de la familia, mientras que sus familiares directos, S11 y S12 tienen valores mayores que él (2,67 y 3,10 respectivamente).

Tampoco se detectan diferencias entre formas clínicas en la familia EM-1 donde P1 y P4, afectados de EMRR y EMSP respectivamente, tienen un valor de wGRS similar (10,18 y 10,02), así como P2 (EMSP) y P3 (EMRR) con valores de 8,81 y 8,82 respectivamente.





**Figura 44.** wGRS de cada uno de los individuos incluidos en el estudio y su relación de parentesco.

No se observa por tanto diferencia en el perfil de enfermos e individuos sanos medido por GRS en ninguna de las dos familias. Además, la frecuencia de alelos de riesgo fue menor en la familia EM-2. Los individuos afectados de EM en esta familia tienen una frecuencia de  $3,98 \pm 2,03$ , menor que la de individuos sanos ( $4,03 \pm 0,99$ ). En el caso de la familia EM-1, los pacientes presentan una frecuencia de alelos de riesgo mayor ( $8,97 \pm 0,82$ ) que la de individuos sanos ( $8,18 \pm 1,26$ ). Se detecta por tanto un aumento del número de alelos de riesgo (uGRS) de 2,3 veces en pacientes y 2 veces en individuos sanos entre ambas familias.

---

# DISCUSIÓN

## ESTUDIO Y VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES EN SUERO Y LCR

No existen hasta la fecha manifestaciones clínicas ni pruebas de laboratorio específicas que permitan determinar por sí solas el diagnóstico de EM. Los criterios diagnósticos actuales se basan en manifestaciones clínicas y paraclínicas, pero es necesario habitualmente un seguimiento en el tiempo tras la aparición de los primeros síntomas. La importancia del diagnóstico precoz reside en poder agilizar la toma de decisiones terapéuticas y retrasar la discapacidad ocasionada por la enfermedad, aumentando así la calidad y expectativa de vida de los pacientes afectados. Esta urgencia en el diagnóstico se pone en evidencia en la revisión de Polman a los criterios de McDonald de 2010, en la que se considera que, tras la aparición de un CIS (episodio neurológico de inflamación o desmielinización en el SNC de al menos 24 horas de duración), se podría establecer el diagnóstico de EM considerando a la vez otras pruebas radiológicas y evitando así el seguimiento de los síntomas, que supondría un retraso en el diagnóstico y tratamiento. Más aún, en la actualidad no existe un marcador clínico o biológico específico capaz de diferenciar la forma EMRR de la EMPP, ni de predecir qué pacientes van a desarrollar la forma EMSP.

La búsqueda de biomarcadores capaces de predecir el diagnóstico y el curso de la enfermedad es por tanto esencial para iniciar tratamiento y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en las formas progresivas. La RMN ha mejorado mucho el manejo de pacientes con EM, si bien no es capaz de diferenciar entre las formas clínicas. Otros criterios paraclínicos como las BOC, además de requerir pruebas invasivas, carecen de especificidad durante las etapas tempranas de la enfermedad, y tampoco sirven para discriminar entre formas clínicas. Este hecho es importante, ya que las formas progresivas carecen de tratamientos eficaces en la actualidad y la mayoría de las terapias utilizadas producen efectos adversos en los pacientes. Por tanto, existe una necesidad urgente en identificar y predecir la evolución de los pacientes con EM para permitir un abordaje precoz y específico del tratamiento que, si bien no curan la enfermedad, puedan frenar el avance de la discapacidad.

En este trabajo se ha desarrollado un algoritmo diagnóstico y pronóstico que pretende ser una herramienta útil en la práctica clínica diaria para el diagnóstico diferencial de la EM frente a otras enfermedades neurológicas, y que a su vez permite

predecir el curso clínico de la enfermedad. Esta herramienta se basa en un análisis logístico multivariante (árbol de decisión), algoritmo que clasifica los individuos teniendo en cuenta las prevalencias previas de las enfermedades en la población europea y que nos va a permitir clasificar y predecir el riesgo de EM basándose en los niveles de dos biomarcadores en sangre al inicio de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Este tipo de algoritmos se utiliza en la predicción de modelos en diferentes enfermedades y es ampliamente aceptado en el contexto de otras patologías. Entre los 12 biomarcadores candidatos estudiados con este propósito, la IL-7 e IP-10 son los que mejor diferencian entre estos grupos. Los niveles de IL-7 en suero sirven, en primer lugar, para diferenciar entre pacientes con EM de aquellos con otras enfermedades neurológicas. Los niveles por debajo del punto de corte establecido en este análisis, 141 pg/ml, presentan el mayor riesgo de padecer EM (OR: 6,5). Este valor de OR mide la asociación entre dos variables (en este caso “EM” y “no EM”), de manera que un valor de OR=1 indica ausencia de diferencia entre ambas variables, y valores mayores a 1 indican un mayor riesgo a EM. Es decir, el riesgo de EM cuando se obtienen valores inferiores al punto de corte es de 6,5 veces mayor que de no padecerla. Un 85,1% de los pacientes con EMRR y un 80% de los pacientes con EMPP tendrían niveles de IL-7 inferiores a este valor. Además, en el caso de los pacientes con EMRR, valores por debajo de 141 pg/ml suponen el mayor riesgo (OR: 5,7) para esta forma clínica. Por tanto, la consideración de los niveles de IL-7 por sí sola permite discriminar con la mayor precisión tanto pacientes afectados de EM estudiados conjuntamente, como diferenciar específicamente aquellos afectados con la forma EMRR.

Tras considerar conjuntamente los niveles de un segundo biomarcador, la quimiocina IP-10, se consigue descartar el diagnóstico de EMPP con una alta especificidad, debido a que el 73% de los pacientes EMPP presentan IP-10 inferior a 570 pg/ml. El riesgo asociado a padecer EMPP en este nodo del árbol de decisión es extremadamente elevado (OR: 22). A este valor de OR le acompaña un intervalo de confianza (IC) amplio (2,7-481,7), que es reflejo del pequeño tamaño muestral de este grupo clínico. El IC expresa los límites que con una cierta seguridad contendrán ese verdadero valor de OR y su amplitud nos informa sobre la precisión de la estimación, de manera que cuanto menor es la dispersión de los datos, más estrecho es el intervalo y, en consecuencia, más precisa es una estimación. Hay que tener en cuenta que, a pesar de disponer de un número relativamente bajo de pacientes con la forma EMPP, este



algoritmo considera las prevalencias previas de la enfermedad de manera que en nuestra serie, debido al esfuerzo por reclutar pacientes con EM, la forma EMPP estaría sobreexpresada con respecto a otras enfermedades neurológicas y el propio análisis estadístico multivariante resuelve a su vez posibles sesgos.

Aunque esta herramienta presenta ciertas limitaciones y no alcanza una precisión del 100% en la capacidad de discriminar la enfermedad, su elevado valor predictivo negativo permite descartar la enfermedad con gran exactitud, sobre todo en aquellos pacientes con la forma clínica EMPP. Esta prueba, con una sensibilidad del 73,3 % y especificidad del 85,3% para el diagnóstico de estos pacientes, presenta una ventaja respecto a la determinación de BOC en LCR que, a pesar de estar presentes en el LCR del 95% de casos de EM, no son específicas de la enfermedad (son reflejo de la naturaleza inflamatoria crónica), con un valor de especificidad de aproximadamente un 62,5% (280). La utilización de suero en lugar de LCR además aporta un valor añadido a esta determinación y facilita su implementación en la práctica clínica diaria por su fácil acceso. La implantación de algoritmos de este tipo en la práctica clínica ha aumentado en los últimos años debido a su facilidad en la interpretación y su utilidad como ayuda o segunda opinión en el manejo de los pacientes. Es importante señalar que el papel fundamental de este algoritmo es el de complementar y no sustituir a la historia clínica y la exploración. Su utilización junto con la determinación de BOC en el diagnóstico de pacientes EMPP, aumentaría la especificidad y evitaría el sobrediagnóstico al que puede conducir la determinación aislada de BOC.

El estudio combinado de varios biomarcadores aumenta la sensibilidad y especificidad diagnósticas, al igual que observamos en nuestro estudio previo (mediante un modelo de regresión logístico) que consideraba grupos de dos y tres biomarcadores con elevado poder diagnóstico y pronóstico, superior al obtenido en el estudio individual de biomarcadores (240). En este caso, el desarrollo del algoritmo de decisión supone un aumento en la especificidad de la prueba del 15% respecto al estudio independiente de IL-7 e IP-10. A pesar de ello, se utilizó como predictores independientes del diagnóstico (IL-7, IL-1ra, bFGF, Mig e IP-10) o pronóstico (Mig, IP-10 y eotaxina), es una herramienta útil en la toma de decisiones del paciente individual, pues en todos los casos se alcanzan valores elevados de sensibilidad y especificidad, aunque se requieren estudios prospectivos que confirmen los resultados en nuestro estudio. Existe buena concordancia entre el análisis univariante y

multiparamétrico sobre el poder diagnóstico y pronóstico de IL-7 e IP-10, puesto que su análisis individual muestra el máximo valor de sensibilidad y especificidad para IL-7 como marcador diagnóstico (73% y 70,8%) y para IP-10 como biomarcador pronóstico independiente (80% y 77%).

Pocos estudios sobre biomarcadores en EM han sido útiles en la práctica clínica, debido principalmente a su falta de validación. Nuestro estudio valida e identifica biomarcadores capaces de diagnosticar y predecir el curso de la enfermedad. En la búsqueda de aumentar la potencia de estos estudios y poder elaborar guías estandarizadas de práctica clínica, cada vez existen más análisis sistemáticos o meta-análisis cuya conclusión global depende en gran medida de la homogeneidad de los estudios incluidos. En nuestro caso, la utilización de muestras adquiridas en las fases tempranas de la enfermedad no sólo minimiza las diferencias potenciales en el patrón de biomarcadores entre individuos, sino que aporta un valor añadido al desarrollo de métodos de diagnóstico estandarizados. Así, además de utilizar una muestra homogénea en lo posible en cuanto al tiempo de evolución de la enfermedad, nuestro estudio aporta otras ventajas, como su carácter multicéntrico y el amplio tamaño de la muestra.

Otro de los objetivos de este estudio es profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la EM, para lo que el estudio de muestras de LCR al inicio clínico de la enfermedad permite una aproximación más fidedigna a la patología, proporcionando información sobre el estado inmunológico basal de estos individuos en el momento de su establecimiento. El estudio del LCR refleja con mayor fidelidad muchos de los procesos que tienen lugar localmente en el SNC y es considerado una fuente excepcional de marcadores específicos relacionados con la patología. Las muestras de suero, aunque son más fáciles de obtener, no son la mejor elección para estas aproximaciones puesto que pueden existir factores de confusión y que los niveles de biomarcadores estén influenciados por las funciones hepática y renal y por algunas infecciones. El estudio de ambas muestras, suero y LCR, conjuntamente permite obtener una información más completa e integrada de la situación inmunológica del paciente en el contexto de la EM. La disminución de los niveles de IL-1ra y bFGF tanto en suero como en LCR en pacientes con EM sería de especial importancia por su implicación en la respuesta inflamatoria y mecanismos de regeneración tisular, que podrían repercutir en el establecimiento y desarrollo de la EM. Estudios en el modelo animal de EAE asocian al IL-1ra, por su papel antagonista con la IL-1, con el retraso en

el inicio y la disminución en los signos clínicos de la EAE (269). Nuestro estudio muestra una disminución de sus niveles en la EM, especialmente significativa en el LCR de pacientes con la forma progresiva de la enfermedad, que podría reflejar un bloqueo en el mecanismo antiinflamatorio que conduciría a un aumento en la secreción de IL-1 por macrófagos y microglía presentes en lesiones agudas y crónicas activas de pacientes con EM (281–283). Por otro lado, debido a su función principal participando en la regulación del crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia de progenitores gliales del SNC en respuesta a la desmielinización (284,285), la disminución en los niveles de bFGF podrían reflejar un defecto en la reparación de la mielina en estos pacientes que conducirían a una desmielinización crónica subsecuente.

Otro aspecto especialmente destacable en el estudio del LCR es la disminución significativa en los niveles de biomarcadores proinflamatorios (IL-7, Mig, RANTES, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ), algunos de ellos en suero y LCR, sobre todo en aquellos pacientes con la forma clínica EMRR, forma predominantemente inflamatoria. Aunque los niveles de MCP-1 y MIP-1 $\beta$  muestran diferencias en pacientes con EMRR respecto a individuos con otras enfermedades neurológicas estudiados globalmente, su valor es similar al del grupo inflamatorio (ENI), por lo que estos cambios observados serían resultado principalmente de la inflamación, y no podrían considerarse específicos de la enfermedad. La disminución de IL-7, Mig y RANTES en pacientes con EMRR en las primeras fases de la enfermedad parece enfatizar su papel en el desarrollo de la enfermedad. Estos tres marcadores participan bien en la coestimulación y la expansión extratímica de linfocitos T inflamatorios (286) o bien en la quimiotaxis de células Th1 preferentemente (279,280), promoviendo fuertemente la respuesta inflamatoria. Nuestro estudio, compatible con los resultados previos, ha detectado una disminución significativa en los niveles de ambas quimiocinas en pacientes con EM, disminución más pronunciada en la forma progresiva que en la inflamatoria, como cabría esperar por su importancia potencial en el brote, donde se han visto aumentadas (183,190). La disminución de IL-7, incluso comparado a enfermedades no inflamatorias, hace que este hallazgo sea especialmente relevante y podría considerarse específico de la enfermedad. Niveles bajos de IL-7 en ratón, se han asociado con un aumento de la proliferación de linfocitos T frente a autoantígenos durante la linfopenia. Esta disminución conduce a un aumento de expresión de moléculas MHC-II en CD<sub>4</sub>, lo que finalmente produce un incremento de la proliferación homeostática de linfocitos T, promoviendo así la

respuesta inmunológica incluso frente a autoantígenos (287). Mientras que el estudio previo muestra un incremento de IL-7 los niveles en el subgrupo de pacientes en brote posteriormente en el curso de la EM, la disminución en las primeras etapas de la enfermedad podría estar reflejando una respuesta inmunitaria basal defectuosa o insuficiente y un mantenimiento anómalo de la homeostasis inmunológica.

Las seis quimiocinas incluidas en el panel de biomarcadores están reguladas por la DPP4, enzima clave en la inmunoregulación (288). La DPP4 desempeña funciones relevantes en la coestimulación de linfocitos T y ha sido relacionada con ciertas patologías autoinmunes donde tendría un papel inmunoregulador (289,290). En la EM, los estudios realizados muestran resultados contradictorios donde, por una parte su expresión en linfocito T se asocia a una mayor actividad clínica y número de lesiones activas (291), y por otro lado su inhibición reduce el riesgo de incidencia de la enfermedad (292). Por otra parte, se han detectado niveles disminuidos significativamente tanto de la actividad de la DPP4 como de forma soluble de la enzima (sDPP4) en plasma de pacientes con EM comparado con controles sanos, sugiriendo un defecto en el papel inmunoregulador en el contexto de la enfermedad (293). Resultados similares han sido descritos para otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus o la artritis reumatoide (294,295). Nuestros resultados muestran una disminución de la actividad en LCR y en suero, sobre todo en pacientes con EMRR, pero no se observan diferencias en los niveles de la forma soluble. Esto podría deberse a que, aunque la mayoría de actividad DPP en plasma se debe a la DPP4, podríamos haber medido a su vez la actividad de otras enzimas de la misma familia, como DPP8 y 9, asociadas con inflamación intestinal y presentación antigénica o señalización intracelular respectivamente (296). Esta disminución en la actividad podría traducirse en un defecto en la inmunoregulación ejercida por la DPP4 sobre linfocitos T.

Respecto al estudio de las isoformas de la quimiocina IP-10, que se encuentra disminuida en la EM, no fuimos capaces por ello de detectar diferencias entre ambos, con niveles indetectables de la forma agonista. Para el estudio en LCR sería interesante aumentar el tamaño muestral en cada uno de los grupos para poder esclarecer si existe una desregulación en la proporción de las formas agonista y antagonista a este nivel en pacientes con EM.

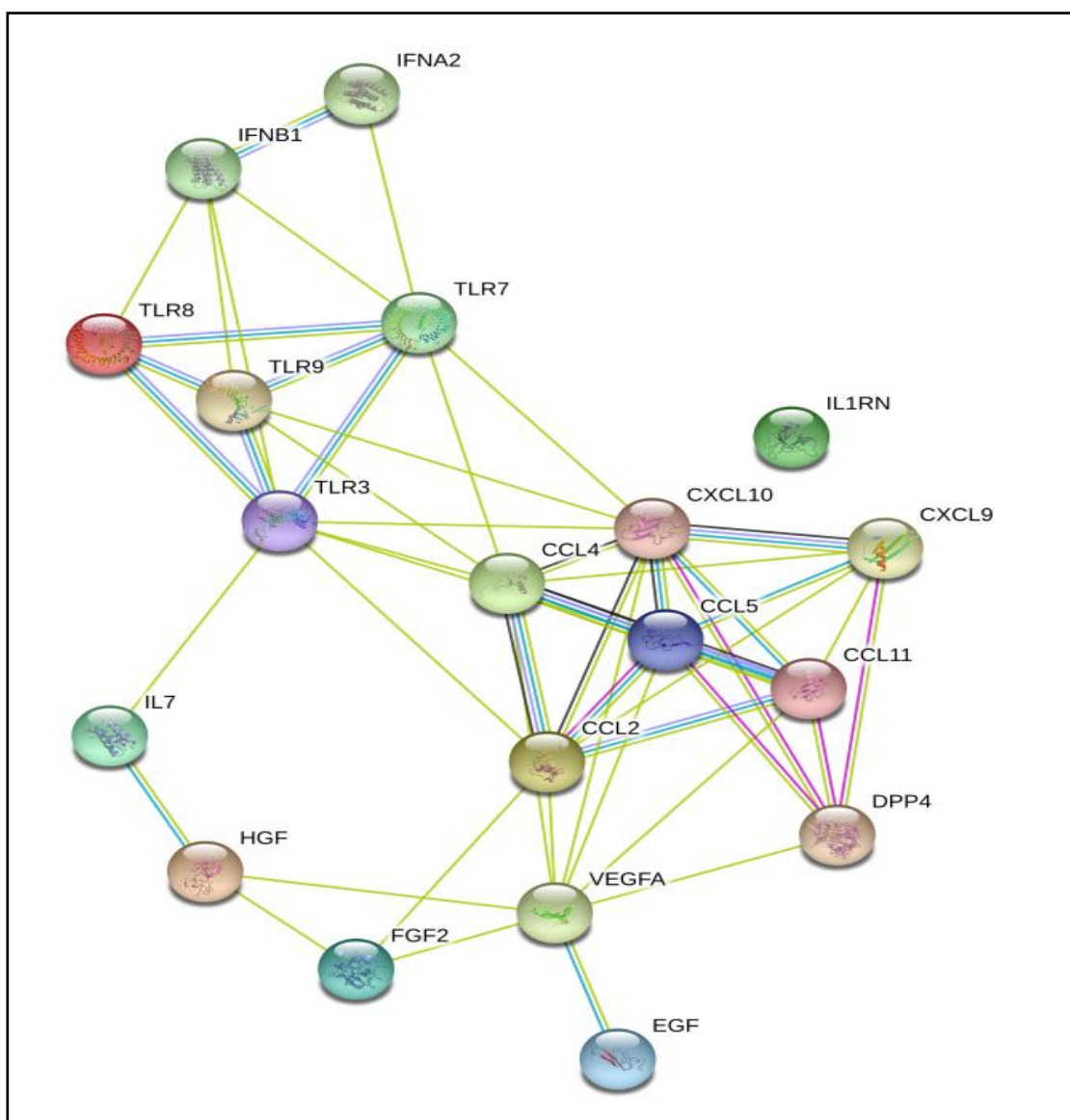
El análisis global de los resultados obtenidos muestra una disminución significativa de citoquinas y quimiocinas clave en procesos neuroinflamatorios y que

median el tráfico leucocitario de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T, lo que podría indicar, como se mencionó previamente, un defecto basal en la respuesta inmunitaria y podemos especular, frente a determinadas infecciones víricas. Además, la correlación negativa con el EDSS de la mayoría de marcadores de LCR apoya esta hipótesis patogénica. Sólo en el caso de IL-7, podría afirmarse que, a pesar de las diferencias en el número de células presentes en el LCR, su disminución, también significativa con respecto a controles ENNI, la convierten en el marcador más específico de la enfermedad, cuya disminución tendría una implicación directa en la patogénesis de la EM.

Los estudios en modelos animales de EM indican que la inflamación podría tener un doble papel en la EM. Por un lado, el bloqueo de IP-10 en el modelo de EAE resulta en una mejoría clínica e histológica con supresión de la linfoproliferación mientras que no hay cambios en los signos clínicos, inflamación, desmielinización, persistencia viral o respuesta de anticuerpos en el modelo de TMEV-IDD (297). Este hallazgo, junto con el hecho de que la inyección de IFN- $\beta$  induzca un fuerte aumento transitorio de niveles de IP-10, IL-7 u otras moléculas proinflamatorias en pacientes con EMRR estable (298,299), sugiere un doble efecto de la inflamación en la EM. También podríamos inferir, que al no existir un defecto basal en la respuesta de las quimiocinas y citoquinas estudiadas en los modelos animales, no se pueden extraer conclusiones extrapolables en la enfermedad humana. Mientras tanto, la baja actividad DPP en LCR de pacientes con EM sería compatible con estos hallazgos y aportaría una nueva aproximación en el entendimiento funcional de las primeras fases de establecimiento de la enfermedad.

## EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LA VÍA DE IFN-TIPO I

La disminución y desregulación de algunos de los analitos estudiados en el apartado anterior, la mayoría relacionados con la vía de IFN-tipo I (Figura 45) y el hecho de que el IFN- $\beta$  sea el tratamiento de primera línea en pacientes con EM, con notables efectos beneficiosos en la mayoría de pacientes con EMRR, nos llevó a explorar funcionalmente las vías de señalización que conducen a la producción de esta potente citoquina antiviral. Además, la administración de IFN- $\beta$  se ha visto que promueve el aumento de ciertas citoquinas y quimiocinas previamente estudiadas y disminuidas en EM, como IL-7 o IP-10 (298,299), por lo que todos estos hallazgos nos llevan a evaluar un posible defecto funcional a este nivel.



**Figura 45.** Relaciones funcionales de los marcadores estudiados en EM, y su relación con IFN-tipo I. Imagen obtenida con la base de datos STRING (300).

Como se mencionó anteriormente, en muchas ocasiones la valoración de posibles defectos funcionales del sistema inmunitario se ven enmascarados en sangre periférica por mecanismos de compensación y de redundancia con otras vías de señalización, como se demostró en la inmunodeficiencia primaria descrita en la encefalitis por virus herpes simple, que se debe a una mutación de la vía del TLR3 (301). Por esta razón, se planteó el estudio en paralelo de PBMCs y fibroblastos, como la mejor aproximación para detectar posibles defectos funcionales en la vía de IFN-tipo I, tanto a nivel periférico como del SNC, respectivamente. Existen varios receptores del sistema inmunitario innato que conducen a la producción de IFN- $\beta$  tras su estimulación, y muchos de ellos se han visto relacionados con la aparición o progresión de EM donde, una señalización alterada conduciría a un exceso en la respuesta inflamatoria y adaptativa autoinmune. Así, los receptores TLR3, TREM-2 y CLR s parecen jugar un papel protector importante en el desarrollo de la EM, mientras que TLR2 y NLRP3 parecen favorecerlo (revisado en (123)).

Se evaluó la respuesta a estímulos virales y frente a agonistas de los receptores TLR3, TLR4, TLR7/8, TLR9, RIG-I y MDA-5, ya sea estimulando vías concretas con péptidos sintéticos, o conjuntamente todas las vías con péptidos virales (LAMP, EBNA y VVH-6). Nuestros resultados preliminares en PBMCs muestran una disminución en el porcentaje de linfocitos T<sub>Reg</sub> en pacientes con EM tras la estimulación con péptidos virales frente a controles sanos, compatible con el defecto descrito en la EM y otras enfermedades autoinmunes (302). Los estudios publicados que evalúan la capacidad de producción de IFN-tipo I y la evaluación de estas vías en sangre periférica de pacientes con EM han mostrado resultados muy contradictorios, muchas veces dependiente de si el estudio es en modelos animales o humanos. En estos resultados podría influir la existencia de diferentes vías que conducen a la producción del mismo producto, además de la gran heterogeneidad clínica, patogénica y de respuesta al tratamiento de los pacientes.

El SNC se ha considerado durante mucho tiempo un lugar privilegiado desde el punto de vista inmunológico. Sin embargo, se sabe que dentro del SNC se dan respuestas inflamatorias a infecciones tanto locales como sistémicas por parte del sistema innato (110). En la búsqueda de la mejor aproximación para estudiar el SNC, los estudios con cultivos de fibroblastos de piel han sido utilizados con éxito para elucidar las bases moleculares y bioquímicas de un número de enfermedades

neurológicas (303). El perfil de expresión de PRRs en este caso es similar al de células del SNC, donde existe una gran ausencia de expresión de la mayoría de ellos. La microglia expresa la mayoría de receptores TLR, mientras que astrocitos y oligodendrocitos expresan únicamente TLR2 y TLR3. Por su parte, las células neuronales expresan TLR3, TLR7 y TLR8 (304).

Nuestros resultados preliminares de este estudio funcional muestran una respuesta disminuida del paciente con EMRR frente a estímulos virales de la vía del TLR3 con el péptido sintético pI:C. Este estímulo, cuando se administra directamente en el sobrenadante del cultivo, llega al interior celular por la vía endosómica, de manera que estimularía mayoritariamente la vía del TLR3. La administración de pI:C con lipofectamina, hace que el estímulo entre directamente al citosol de la célula, estimulando únicamente a los receptores citosólicos de la familia RIG-I. En este caso, se observa un aumento en la producción de IFN- $\beta$  por parte del paciente EMRR, aunque no llega a alcanzar el nivel de individuos sanos o con EMPP. Puesto que ambos tipos de receptores, tanto RIG-I y MDA-5 como TLR3 confluyen en las mismas vías de señalización, estos resultados llevarían a sospechar un posible defecto en la vía de señalización del TLR3. De hecho, un estudio reciente muestra que pacientes con EMRR tendrían disminuida en sangre periférica la expresión de TLR3, IFN-tipo I (tanto IFN- $\alpha$  como IFN- $\beta$ ) y de ciertas moléculas proinflamatorias tras estimular esta vía y comparando con CS. Esto no se observa en pacientes con la forma progresiva EMSP, que presentan un aumento en la expresión del receptor TLR3 además de la elevada producción de moléculas proinflamatorias. Sin embargo, la expresión de IFN- $\beta$  tampoco aumenta en este caso (305). En nuestro caso, al estudiar la forma primaria progresiva, los resultados no serían comparables con los de este estudio, donde los pacientes con EMSP han pasado previamente por una fase altamente inflamatoria con mecanismos diferentes a los que promueven inflamación en las formas progresivas (306). Una posible explicación de que la producción de IFN sea el doble (medida por D.O.) en el caso del CS y EMPP cuando se trata con lipofectamina, y suponiendo que la vía de señalización RIG-I en el paciente EMRR está intacta, se explicaría debido a que no todo el pI:C fue tranfectado a las células y probablemente parte quedó en forma soluble, estimulando también el TLR3 en todos los pacientes. Por otro lado, la incubación previa de los fibroblastos con IFN- $\alpha$ , que actúa como un fuerte estimulador de la vía del IFN-tipo I, es el único caso en el que la producción de IFN- $\beta$  es similar en



los tres grupos de estudio. Estos resultados requieren una validación en un número mayor de pacientes, que es objeto de un estudio en marcha con generación de líneas de fibroblastos de nuevos pacientes que requieren meses de desarrollo. De validarse nuestros resultados, supondrían un cambio en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, donde hasta ahora se ha otorgado como causa de la respuesta autoinmune a ciertos factores ambientales, aunque sin entender bien el mecanismo exacto por el que estos factores tendrían relevancia. El hecho de que la estimulación de TLR3 en el modelo animal EAE se asocie con una supresión de la enfermedad dependiente de IFN- $\beta$  (307) indica la importancia de este receptor viral en la inmunoregulación de la enfermedad.

El conjunto de los resultados previos sobre biomarcadores y los resultados preliminares sobre la vía del interferón apoyarían la existencia de un defecto intrínseco en la respuesta antiviral y que la hipótesis vírica, muy aceptada hoy en día, podría conducir finalmente al desarrollo de una reacción autoinmune (revisado en (123)). Actualmente existen varios estudios que proponen una explicación molecular para la conexión entre la infección vírica y el desencadenamiento de una respuesta autoinmune. Por un lado, la molécula CD46, reguladora del complemento y que funciona como receptor celular del VHH-6, podría quedar dentro de la envuelta del virus y actuar como un autoantígeno. De hecho, existen autoanticuerpos para esta proteína en pacientes con EM (308). Por otro lado, la proteína  $\alpha$ B-crystalina, proteína de estrés expresada mayoritaria y casi exclusivamente en astrocitos y oligodendrocitos está aumentada en pacientes con EM. Ciertos virus promueven su expresión *in vitro* y el aumento de su expresión en oligodendrocitos y astrocitos promovería la ruptura de mielina y la posterior respuesta autoinmune frente a este autoantígeno (309).

En una revisión reciente sobre la inmunidad innata y EM, hemos asociado nuestros hallazgos con los descritos en la literatura para construir una hipótesis (Figura 11) sobre los mecanismos que, tras la infección vírica, estarían alterados y, superando los mecanismos de tolerancia, podrían conducir al inicio y establecimiento de la respuesta autoinmune en EM (123). Los resultados derivados de nuestro estudio serían coherentes con esta hipótesis, que requiere profundizar en los mecanismos y un mayor número de pacientes para su demostración.

## EM FAMILIAR

La EM se considera una enfermedad multigénica, en la que sólo se han identificado ciertos polimorfismos asociados a un mayor o menor riesgo a padecer la enfermedad. Las estimaciones recientes sugieren que los loci de riesgo identificados en EM explican aproximadamente solo un cuarto (~27%) de la heredabilidad total, la mayor parte de la cual se atribuye al locus HLA (310). Tanto la agregación familiar en la EM, como la mayor incidencia demostrada de otras enfermedades autoinmunes en familiares de primer grado, hacen el estudio genético de estos casos familiares un campo muy interesante. La búsqueda de ciertos factores genéticos que puedan contribuir en mayor medida al desarrollo de la enfermedad en estos casos familiares, nos puede ayudar en un futuro a comprender mejor el peso genético y la importancia de estas variantes en la enfermedad, así como facilitar la detección precoz de aquellos individuos con mayor riesgo de padecerla. Es por esto que nos proponemos identificar ciertas variantes genéticas que ayuden en el diagnóstico y conocimiento de la enfermedad.

Considerados individualmente, los SNPs incrementan mínimamente el riesgo a padecer la enfermedad. El objetivo de los GRS es integrar un amplio número de variantes genéticas asociadas a un factor de riesgo, de manera que se consiga ampliar la cobertura de riesgo de estas variantes de manera más eficaz a como lo hacen individualmente. Existen numerosos algoritmos de predicción de riesgo desarrollados para otras enfermedades, aunque proporcionan la mayoría una modesta discriminación. El objetivo de este estudio fue determinar si la inclusión de un GRS podría servir para mejorar la discriminación y predicción de la enfermedad en la población general. El estudio en varios casos de EM familiar pretende además conocer mejor aquellos SNPs con una repercusión media-alta en el desarrollo de la enfermedad. Puesto que el wGRS tiene en cuenta el riesgo individual de cada SNP, consideramos su utilización más recomendable cuando se dispone de estos datos.

En contraste a nuestra hipótesis de trabajo, por la que se esperaba que la agregación familiar de casos EM estaría asociada a una carga genética mayor para alelos de riesgo, los resultados obtenidos no son concluyentes y el beneficio clínico de esta información genética en nuestro estudio es limitada. Por un lado, tanto individuos sanos como enfermos dentro de cada familia presentan un GRS similar, o incluso mayor en algunos casos en individuos sanos. La ausencia de diferencias entre formas clínicas

tampoco aporta un valor pronóstico de este índice. Además, se observa el menor valor de GRS en la paciente con debut más precoz (al igual que su hermana gemela monocigótica que, aun sin estar diagnosticada por no haber manifestado clínicamente la enfermedad, presenta lesiones por RM). Además, existe una diferencia significativa en el GRS entre individuos de una familia y la otra. Nuestro estudio genético no demostró utilidad en la estratificación del riesgo a EM, y no hay evidencias de que se pudiese extrapolar a otros individuos fuera de esta familia.

La combinación de la historia familiar con una medida cuantitativa del riesgo genético podría permitir eventualmente la implementación de una herramienta de despistaje para descubrir evidencias clínicamente silentes de la enfermedad entre los familiares sanos de primer grado de pacientes con EM, los cuales presentan entre 20 y 50 veces más riesgo de desarrollar EM que la población general (311). Aunque nuestros resultados no arrojen ningún dato concluyente, es necesario seguir realizando estudios del perfil genético en casos de EM familiar mediante el uso de secuenciación a gran escala que faciliten el entendimiento de la biología de las enfermedades comunes para ligar, de una manera más completa, genotipos individuales a fenotipos complejos.

---

# CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo nos permiten concluir que:

1. El modelo de árbol de decisión construido por primera vez con dos biomarcadores en suero al inicio de la enfermedad neurológica, permite discriminar con la mayor especificidad tanto pacientes afectados con EM estudiados conjuntamente, como diferenciar específicamente aquellos afectados con la forma EMPP.
2. El uso del árbol de decisión con IL-7 y Mig en la práctica clínica habitual aportaría un valor añadido a la determinación de BOC en el diagnóstico de individuos con la forma EMPP, donde la especificidad no llega a ser superior al 60%, hasta alcanzar una especificidad del 85,3%.
3. El estudio individual de biomarcadores valida la IL-7, IL-1ra y Mig e incluye IP-10 y bFGF como biomarcadores sanguíneos de utilidad en el diagnóstico de EM. Además, los niveles de IP-10, Mig y eotaxina en sangre tienen claras implicaciones pronósticas en pacientes con EM.
4. La actividad de DPP4 está significativamente disminuida en LCR de pacientes con EM al inicio de la enfermedad.
5. En el estudio de la fisiopatología, la disminución de la IL-7 parece ser específica de la enfermedad en las primeras fases de desarrollo frente a otras enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias.
6. Resultados preliminares del estudio de la vía de IFN-tipo I en fibroblastos muestra un defecto en la funcionalidad de la vía del TLR3 en pacientes con EMRR en respuesta a estímulos virales. Este estudio requiere su confirmación con mayor número de pacientes.
7. El GRS calculado a partir de los 9 SNPs de riesgo asociados a EM no muestra utilidad en la estratificación del riesgo a EM, ni en su pronóstico en 2 familias estudiadas, y no hay evidencias de que se pueda extrapolar a otros individuos fuera de esta familia.

---

# REFERENCIAS

1. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2000;343(13):938–52. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200009283431307%5Chhttp://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM200009283431307>
2. MSIF. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. *Mult Scler Int Fed*. 2013;1–28.
3. WHO. Atlas: Multiple sclerosis resources in the world 2008. *World Heal Organ*. 2008;51.
4. McCombe PA, Greer JM, Mackay IR. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med* [Internet]. 2009 Dec [cited 2016 Feb 2];9(9):1058–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747114>
5. Pugliatti M, Riise T, Sotgiu MA, Sotgiu S, Satta WM, Mannu L, et al. Increasing incidence of multiple sclerosis in the province of Sassari, northern Sardinia. *Neuroepidemiology* [Internet]. 2005 Jan [cited 2016 Feb 2];25(3):129–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15990443>
6. Houzen H, Niino M, Hirotani M, Fukazawa T, Kikuchi S, Tanaka K, et al. Increased prevalence, incidence, and female predominance of multiple sclerosis in northern Japan. *J Neurol Sci* [Internet]. 2012 Dec 15 [cited 2016 Feb 2];323(1–2):117–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995683>
7. Krökki O, Bloigu R, Reunanen M, Remes AM. Increasing incidence of multiple sclerosis in women in Northern Finland. *Mult Scler* [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Feb 2];17(2):133–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935028>
8. Orton S-M, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan S V, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2015 Oct 27];5(11):932–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052660>
9. Maghzi AH, Ghazavi H, Ahsan M, Etemadifar M, Mousavi S, Khorvash F, et al. Increasing female preponderance of multiple sclerosis in Isfahan, Iran: a population-based study. *Mult Scler* [Internet]. 2010 Mar [cited 2016 Feb 2];16(3):359–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086021>
10. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* [Internet]. Jan [cited 2016 Feb 2];11(4):411–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15817524>
11. Salemi G, Callari G, Gammino M, Battaglieri F, Cammarata E, Cuccia G, et al. The relapse rate of multiple sclerosis changes during pregnancy: a cohort study. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2004 Jul [cited 2016 Feb 2];110(1):23–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180803>
12. Sánchez-Ramón S, Navarro A J, Aristimuño C, Rodríguez-Mahou M, Bellón JM, Fernández-Cruz E, et al. Pregnancy-induced expansion of regulatory T-lymphocytes may mediate protection to multiple sclerosis activity. *Immunol Lett* [Internet]. 2005 Jan 31 [cited 2016 Sep 23];96(2):195–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585323>
13. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, V??csei L, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *European Journal of Neurology*. 2006. p. 700–22.
14. Ebers GC, Daumer M. Natural history of MS. *Eur J Neurol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2016 Feb 2];15(9):881–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18796069>
15. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* [Internet]. 1996 Apr [cited 2014 Dec

- 5];46(4):907–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780061>
16. Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI. A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 1994 Aug [cited 2016 Feb 2];117 ( Pt 4:759–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922463>
17. McDonnell G V, Hawkins SA. Primary progressive multiple sclerosis: a distinct syndrome? *Mult Scler* [Internet]. 1996;2(3):137–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9345378>
18. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 May 15];72 Suppl 1:1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278115>
19. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–52.
20. Masur H, Papke K. Scales and Scores in Neurology: Quantification of Neurological Deficits in Research and Practice [Internet]. 2004 [cited 2016 Feb 2]. Available from: [https://books.google.es/books/about/Scales\\_and\\_Scores\\_in\\_Neurology.html?id=DOU0\\_WDHxhcC&pgis=1](https://books.google.es/books/about/Scales_and_Scores_in_Neurology.html?id=DOU0_WDHxhcC&pgis=1)
21. Roxburgh RH SR, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* [Internet]. 2005 Apr 12 [cited 2016 Feb 19];64(7):1144–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824338>
22. Ramagopalan S V, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Feb 3];9(7):727–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610348>
23. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* [Internet]. 2001 Apr [cited 2015 Dec 30];22(2):117–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11603614>
24. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2016 Feb 3];9(6):599–612. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494325>
25. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* [Internet]. 2006 Dec 20 [cited 2015 Apr 17];296(23):2832–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179460>
26. Lucas RM, Ponsonby A-L, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor B V, et al. Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology* [Internet]. 2011 Feb 8 [cited 2015 Nov 21];76(6):540–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300969>
27. News Center | UC San Francisco [Internet]. [cited 2017 Jan 30]. Available from: <https://www.ucsf.edu/news/2011/08/10431/major-genetic-study-multiple-sclerosis-reveals-dna-hot-spots-disease>
28. Johnson RT. The virology of demyelinating diseases. *Ann Neurol* [Internet]. 1994 [cited 2016 Nov 4];36 Suppl:S54–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8017889>
29. Kakalacheva K, Münz C, Lünemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2011 Feb [cited 2016 Apr 25];1812(2):132–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600868>
30. Levin LI, Munger KL, Rubertone M V, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al. Temporal



- relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* [Internet]. 2005 May 25 [cited 2016 Jan 31];293(20):2496–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15914750>
31. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* [Internet]. 2001 Dec 26 [cited 2016 Feb 3];286(24):3083–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754673>
  32. Lünemann JD, Edwards N, Muraro PA, Hayashi S, Cohen JI, Münz C, et al. Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2006 Jun [cited 2016 Feb 3];129(Pt 6):1493–506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569670>
  33. Ablashi D V, Lapps W, Kaplan M, Whitman JE, Richert JR, Pearson GR. Human Herpesvirus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler* [Internet]. 1998 Dec [cited 2016 Feb 3];4(6):490–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987758>
  34. Ablashi D V, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, Kramarsky B, et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* [Internet]. 1991 Oct [cited 2016 Feb 3];184(2):545–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653487>
  35. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Aug 1 [cited 2016 Jan 14];92(16):7440–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  36. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* [Internet]. 2002 Mar [cited 2016 Feb 3];125(Pt 3):538–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872611>
  37. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Aug 7 [cited 2016 Jan 18];192(3):393–404. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  38. Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2016 Feb 3];61(10):1523–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15477505>
  39. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* [Internet]. 1997 Dec [cited 2016 Feb 3];3(12):1394–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396611>
  40. Simpson S, Taylor B, Dwyer DE, Taylor J, Blizzard L, Ponsonby A-L, et al. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler* [Internet]. 2012 Jun [cited 2016 Feb 3];18(6):799–806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084489>
  41. Sotelo J, Corona T. Varicella zoster virus and relapsing remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Int* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Feb 3];2011:214763. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3195831&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

42. Ordoñez G, Martinez-Palomo A, Corona T, Pineda B, Flores-Rivera J, Gonzalez A, et al. Varicella zoster virus in progressive forms of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. 2010 Oct [cited 2016 Feb 3];112(8):653–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483530>
43. Herrmann I, Kellert M, Spreer A, Gerber J, Eiffert H, Prinz M, et al. Minocycline delays but does not attenuate the course of experimental autoimmune encephalomyelitis in *Streptococcus pneumoniae*-infected mice. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Feb 3];59(1):74–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079237>
44. Smits HH, Everts B, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Feb 8];10(1):3–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2816799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Fleming JO, Cook TD. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology* [Internet]. 2006 Dec 12 [cited 2015 Dec 18];67(11):2085–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159130>
46. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2008 Jul [cited 2016 Feb 3];9(7):516–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18542080>
47. Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet* [Internet]. 2008 Jun [cited 2016 Feb 4];35(3):179–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2408657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
48. Joller N, Peters A, Anderson AC, Kuchroo VK. Immune checkpoints in central nervous system autoimmunity. *Immunol Rev* [Internet]. 2012 Jul [cited 2015 Dec 21];248(1):122–39. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3674871&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Terasaki PI, Park MS, Opelz G, Ting A. Multiple sclerosis and high incidence of a B lymphocyte antigen. *Science* [Internet]. 1976 Sep 24 [cited 2016 Feb 9];193(4259):1245–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1085490>
50. Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2007 May 15 [cited 2016 Jan 2];165(10):1097–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329717>
51. Marrosu MG, Muntoni F, Murru MR, Costa G, Pischedda MP, Pirastu M, et al. HLA-DQB1 genotype in Sardinian multiple sclerosis: evidence for a key role of DQB1 \*0201 and \*0302 alleles. *Neurology* [Internet]. 1992 Apr [cited 2016 Feb 9];42(4):883–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1565247>
52. Marrosu MG, Murru R, Murru MR, Costa G, Zavattari P, Whalen M, et al. Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2016 Feb 9];10(25):2907–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741834>
53. Becker KG. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med Hypotheses* [Internet]. 2004 Jan [cited 2016 Feb 9];62(2):309–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14962646>
54. Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2009 Jan [cited 2017 Jan 27];10(1):43–55. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg2489>

55. Aulchenko YS, Hoppenbrouwers IA, Ramagopalan S V, Broer L, Jafari N, Hillert J, et al. Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 2008 Dec [cited 2016 Apr 22];40(12):1402–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997785>
56. Bahlo M, Booth D, Broadley S (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* [Internet]. 2009 Jul [cited 2016 Feb 8];41(7):824–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19525955>
57. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009 Feb 15 [cited 2016 Apr 22];18(4):767–78. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4334814&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
58. Comabella M, Craig DW, Camiña-Tato M, Morcillo C, Lopez C, Navarro A, et al. Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500,000 single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Apr 22];3(10):e3490. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2566815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
59. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PIW, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* [Internet]. 2009 Jul [cited 2016 Feb 26];41(7):776–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2757648&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. Martinelli-Boneschi F, Esposito F, Brambilla P, Lindström E, Lavorgna G, Stankovich J, et al. A genome-wide association study in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* [Internet]. 2012 Oct [cited 2016 Apr 22];18(10):1384–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22457343>
61. Matesanz F, González-Pérez A, Lucas M, Sanna S, Gayán J, Urcelay E, et al. Genome-wide association study of multiple sclerosis confirms a novel locus at 5p13.1. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Apr 22];7(5):e36140. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3343041&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. Nischwitz S, Cepok S, Kroner A, Wolf C, Knop M, Müller-Sarnowski F, et al. Evidence for VAV2 and ZNF433 as susceptibility genes for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2010 Oct 8 [cited 2016 Apr 22];227(1–2):162–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598377>
63. Sanna S, Pitzalis M, Zoledziewska M, Zara I, Sidore C, Murru R, et al. Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 2010 Jun [cited 2016 Apr 22];42(6):495–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3786343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 11 [cited 2014 Jul 9];476(7359):214–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3182531&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
65. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* [Internet]. 2007 Nov [cited 2016 Apr 22];39(11):1329–37. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2680141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Aug 30 [cited 2016 Feb 9];357(9):851–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660530>
67. Jakkula E, Leppä V, Sulonen A-M, Varilo T, Kallio S, Kemppinen A, et al. Genome-wide Association Study in a High-Risk Isolate for Multiple Sclerosis Reveals Associated Variants in STAT3 Gene. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2010 Feb 12 [cited 2016 Jan 6];86(2):285–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2820168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Patsopoulos NA, Esposito F, Reischl J, Lehr S, Bauer D, Heubach J, et al. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol* [Internet]. 2011 Dec [cited 2016 Feb 9];70(6):897–912. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3247076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Bashinskaya VV, Kulakova OG, Boyko AN, Favorov AV FO. A review of genome-wide association studies for multiple sclerosis: classical and hypothesis-driven approaches. *Hum Genet*. 2015;134(11–12):1143–62.
70. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Sep 28 [cited 2015 Jan 19];343(13):938–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006371>
71. Ebers GC, Sadovnick AD, Dymment DA, Yee IML, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2004 May 29 [cited 2016 Feb 3];363(9423):1773–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15172777>
72. Sadovnick AD, Ebers GC, Dymment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1996 Jun 22 [cited 2016 Feb 3];347(9017):1728–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8656905>
73. Sadovnick AD, Baird PA. The familial nature of multiple sclerosis: age-corrected empiric recurrence risks for children and siblings of patients. *Neurology* [Internet]. 1988 Jun [cited 2016 Feb 3];38(6):990–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3368082>
74. Ebers GC, Sadovnick AD. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1994 Oct [cited 2016 Feb 3];54(1–2):1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929798>
75. Ebers GC, Yee IM, Sadovnick AD, Duquette P. Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol* [Internet]. 2000 Dec [cited 2016 Feb 3];48(6):927–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11117550>
76. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* [Internet]. 1995 Oct 14 [cited 2016 Jan 31];377(6545):150–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7675080>
77. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* [Internet]. 2008 Oct 25 [cited 2014 Jul 11];372(9648):1502–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18970977>
78. Ban M, Stewart GJ, Bennetts BH, Heard R, Simmons R, Maranian M, et al. A genome screen for linkage in Australian sibling-pairs with multiple sclerosis. *Genes Immun* [Internet]. 2002 Dec

- [cited 2016 Apr 25];3(8):464–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12486604>
79. Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* [Internet]. 1996 Aug [cited 2016 Apr 25];13(4):464–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8696343>
  80. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 1996 Aug [cited 2016 Apr 25];13(4):472–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8696345>
  81. Hermanowski J, Bouzigon E, Forabosco P, Ng MY, Fisher SA, Lewis CM. Meta-analysis of genome-wide linkage studies for multiple sclerosis, using an extended GSMA method. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 Apr 25];15(6):703–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17377519>
  82. GAMES;Cooperative. TMSG. A meta-analysis of whole genome linkage screens in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2016 Feb 9];143(1–2):39–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14575912>
  83. Cree BAC. Multiple sclerosis genetics. *Handb Clin Neurol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Apr 25];122:193–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507519>
  84. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 10 [cited 2016 Dec 21];476(7359):214–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21833088>
  85. De Jager PL, Chibnik LB, Cui J, Reischl J, Lehr S, Simon KC, et al. Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. *Lancet Neurol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2016 Dec 21];8(12):1111–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442209702753>
  86. Akkad DA, Lee D-H, Bruch K, Haghikia A, Epplen JT, Hoffjan S, et al. Multiple sclerosis in families: risk factors beyond known genetic polymorphisms. *Neurogenetics* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2016 Apr 11 [cited 2016 Dec 21];17(2):131–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10048-016-0474-4>
  87. Gourraud P-A, McElroy JP, Caillier SJ, Johnson BA, Santaniello A, Hauser SL, et al. Aggregation of multiple sclerosis genetic risk variants in multiple and single case families. *Ann Neurol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Dec 21];69(1):65–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.22323>
  88. Che R, Motsinger-Reif AA. A New Explained-Variance Based Genetic Risk Score for Predictive Modeling of Disease Risk. *Stat Appl Genet Mol Biol* [Internet]. 2012 Jan 25 [cited 2016 Dec 21];11(4):Article 15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023697>
  89. Dobson R, Ramagopalan S, Topping J, Smith P, Solanky B, Schmierer K, et al. A Risk Score for Predicting Multiple Sclerosis. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2016 [cited 2016 Dec 21];11(11):e0164992. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802296>
  90. Akkad DA, Olischewsky A, Reiner F, Hellwig K, Esser S, Epplen JT, et al. Combinations of susceptibility genes are associated with higher risk for multiple sclerosis and imply disease course specificity. Linker RA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 26 [cited 2016 Dec 21];10(5):e0127632. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0127632>
  91. Esposito F, Guaschino C, Sorosina M, Clarelli F, Ferre' L, Mascia E, et al. Impact of MS genetic loci on familial aggregation, clinical phenotype, and disease prediction. *Neurol Neuroimmunol neuroinflammation* [Internet]. 2015 Aug 9 [cited 2016 Dec 21];2(4):e129. Available from: <http://nn.neurology.org/lookup/doi/10.1212/NXI.0000000000000129>

92. Scheuner MT, Sieverding P, Shekelle PG. Delivery of genomic medicine for common chronic adult diseases: a systematic review. *JAMA* [Internet]. 2008 Mar 19 [cited 2016 Dec 21];299(11):1320–34. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.299.11.1320>
93. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2001 Jul [cited 2015 Dec 13];50(1):121–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11456302>
94. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302.
95. Miller DH, Barkhof F, Nauta JJ. Gadolinium enhancement increases the sensitivity of MRI in detecting disease activity in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 1993 Oct [cited 2016 Feb 19];116 ( Pt 5):1077–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221048>
96. Hattingen E, Magerkurth J, Pilatus U, Hübers A, Wahl M, Ziemann U. Combined (1)H and (31)P spectroscopy provides new insights into the pathobiochemistry of brain damage in multiple sclerosis. *NMR Biomed* [Internet]. 2011 Jun [cited 2016 Feb 18];24(5):536–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674655>
97. Oh U, Fujita M, Ikonomidou VN, Evangelou IE, Matsuura E, Harberts E, et al. Translocator protein PET imaging for glial activation in multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2016 Feb 18];6(3):354–61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3257858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
98. Kostulas VK, Link H, Lefvert AK. Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol* [Internet]. 1987 Oct [cited 2016 Feb 19];44(10):1041–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3632376>
99. Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands--a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2013 Jun [cited 2016 Feb 9];9(6):303–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588351>
100. Link H, Huang Y-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Mar 31];180(1–2):17–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945427>
101. Brettschneider J, Claus A, Kassubek J, Tumani H. Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol* [Internet]. 2005 Sep [cited 2016 Apr 25];252(9):1067–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15789126>
102. Villar LM, Casanova B, Ouamara N, Comabella M, Jalili F, Leppert D, et al. Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Feb 27];76(2):231–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909126>
103. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler* [Internet]. 2008 Nov [cited 2015 Sep 6];14(9):1157–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2850590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
104. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Mar 2 [cited 2016 Feb 9];354(9):942–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510748>

105. Trapp BD, Nave K-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2008 Jan [cited 2015 Apr 3];31:247–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558855>
106. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* [Internet]. 2011 Jul [cited 2016 Mar 29];134(Pt 7):1914–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3122372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
107. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Mar 29];135(Pt 3):886–99. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3286337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
108. Birnbaum G, Kotilinek L, Miller SD, Raine CS, Gao YL, Lehmann P V, et al. Heat shock proteins and experimental autoimmune encephalomyelitis. II: environmental infection and extra-neuraxial inflammation alter the course of chronic relapsing encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2016 Feb 19];90(2):149–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817443>
109. Zozulya AL, Wiendl H. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* [Internet]. 2008 Jul [cited 2016 Feb 9];4(7):384–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18578001>
110. Nguyen MD, Julien J-P, Rivest S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2002 Mar [cited 2016 Feb 9];3(3):216–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994753>
111. Gandhi KS, McKay FC, Cox M, Riveros C, Armstrong N, Heard RN, et al. The multiple sclerosis whole blood mRNA transcriptome and genetic associations indicate dysregulation of specific T cell pathways in pathogenesis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2016 Apr 26];19(11):2134–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190274>
112. Brynedal B, Khademi M, Wallström E, Hillert J, Olsson T, Duvefelt K. Gene expression profiling in multiple sclerosis: a disease of the central nervous system, but with relapses triggered in the periphery? *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010 Mar [cited 2016 Apr 26];37(3):613–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944761>
113. Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H. The pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* [Internet]. 2002 Apr [cited 2016 Apr 26];8(2):93–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990878>
114. Pette M, Fujita K, Kitze B, Whitaker JN, Albert E, Kappos L, et al. Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology* [Internet]. 1990 Nov [cited 2016 Feb 18];40(11):1770–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1700336>
115. Furtado GC, Marcondes MCG, Latkowski J-A, Tsai J, Wensky A, Lafaille JJ. Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2016 Jan 19];181(7):4648–55. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973185&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
116. Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* [Internet]. 1987 Sep 11 [cited 2016 Feb 18];50(6):819–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3621346>

117. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* [Internet]. 1998 Mar 19 [cited 2015 May 12];392(6673):245–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521319>
118. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* [Internet]. 2004 Sep 15 [cited 2016 Jan 21];173(6):3916–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356140>
119. Gimenez MA, Sim J, Archambault AS, Klein RS, Russell JH. A tumor necrosis factor receptor 1-dependent conversation between central nervous system-specific T cells and the central nervous system is required for inflammatory infiltration of the spinal cord. *Am J Pathol* [Internet]. 2006 Apr [cited 2016 Feb 18];168(4):1200–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1606568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
120. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* [Internet]. 2009 May [cited 2016 Jan 14];10(5):514–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19305396>
121. Gidday JM, Gasche YG, Copin J-C, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2005 Aug [cited 2016 Feb 9];289(2):H558–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764676>
122. Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2016 Mar 13];9(6):440–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444308>
123. Fernández-Paredes L, de Diego RP, de Andrés C, Sánchez-Ramón S. Close Encounters of the First Kind: Innate Sensors and Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016 Jan 5 [cited 2016 Mar 15]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26732593>
124. Pashchenkov M V, Pinegin B V, Link K, Boïko AN. [Dendritic cells and their role in inflammation in the central nervous system]. *Zhurnal Nevrol i psikhiatrii Im SS Korsakova / Minist Zdr i meditsinskoï promyshlennosti Ross Fed Vserossiiskoe Obs Nevrol [i] Vserossiiskoe Obs psikiatrov* [Internet]. 2003 Jan [cited 2016 Feb 9];(Spec No 2):39–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12938633>
125. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL, et al. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2006 Feb [cited 2016 Feb 9];65(2):124–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462204>
126. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 Nov 2];23:683–747. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771584>
127. Lu P, Cao Y, Wang M, Zheng P, Hou J, Zhu C, et al. Mature dendritic cells cause Th17/Treg imbalance by secreting TGF- $\beta$ 1 and IL-6 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cent J Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Feb 10];41(2):143–52. Available from: <http://www.termedia.pl/doi/10.5114/ceji.2016.60987>
128. Zhang X, Jin J, Tang Y, Speer D, Sujkowska D, Markovic-Plese S. IFN- $\beta$ 1a inhibits the secretion of Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells via TLR7 up-regulation. *J Immunol* [Internet]. 2009 Mar 15 [cited 2016 Feb 23];182(6):3928–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265172>
129. Wang C, Liu X, Li Z, Chai Y, Jiang Y, Wang Q, et al. CD8(+)NKT-like cells regulate the immune response by killing antigen-bearing DCs. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2016



- Dec 7];5:14124. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep14124>
130. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides “preferentially” polarize CD4<sup>+</sup> T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol* [Internet]. 2007 Feb 7 [cited 2017 Feb 10];8(2):172–80. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni1430>
  131. Miller SD, McMahon EJ, Schreiner B, Bailey SL. Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2007 Apr 21 [cited 2017 Feb 10];1103(1):179–91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1394.023>
  132. Stasiolek M, Bayas A, Kruse N, Wiczarkowicz A, Toyka K V, Gold R, et al. Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2017 Feb 10];129(Pt 5):1293–305. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/aw1043>
  133. Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch K-P, Hanisch U-K, Raasch J, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* [Internet]. 2008 May [cited 2017 Feb 10];28(5):675–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476130800126X>
  134. Guo B, Chang EY, Cheng G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2017 Feb 10];118(5):1680–90. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/33342>
  135. Ibrahim MZ, Reder AT, Lawand R, Takash W, Sallouh-Khatib S. The mast cells of the multiple sclerosis brain. *J Neuroimmunol* [Internet]. 1996 Nov [cited 2016 Feb 9];70(2):131–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8898721>
  136. Rozniecki JJ, Hauser SL, Stein M, Lincoln R, Theoharides TC. Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* [Internet]. 1995 Jan [cited 2016 Feb 9];37(1):63–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7818259>
  137. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2015 Dec 27];102(7):2660–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829592>
  138. Naegel M, Tillack K, Reinhardt S, Schippling S, Martin R, Sospedra M. Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2012 Jan 18 [cited 2016 Feb 9];242(1–2):60–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22169406>
  139. Tani K, Murphy WJ, Chertov O, Oppenheim JJ, Wang JM. The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific Ig production in mice. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2001 Apr 13 [cited 2016 Feb 9];282(4):971–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352647>
  140. Ortega SB, Kashi VP, Tyler AF, Cunnusamy K, Mendoza JP, Karandikar NJ. The disease-ameliorating function of autoregulatory CD8 T cells is mediated by targeting of encephalitogenic CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2016 Feb 9];191(1):117–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3691355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  141. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Nov 17 [cited 2016 Jan 3];186(10):1677–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2199138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

142. Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ* [Internet]. 2010 [cited 2017 Feb 10];51:127–47. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/400\\_2009\\_11](http://link.springer.com/10.1007/400_2009_11)
143. Gigli G, Caielli S, Cutuli D, Falcone M. Innate immunity modulates autoimmunity: type 1 interferon-beta treatment in multiple sclerosis promotes growth and function of regulatory invariant natural killer T cells through dendritic cell maturation. *Immunology* [Internet]. 2007 Nov [cited 2017 Feb 10];122(3):409–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2007.02655.x>
144. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM FL. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. - PubMed - NCBI. *Tha Am J Pathol* [Internet]. 2008 [cited 2016 Apr 26];172(1):146–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tzartos+JS%2C+Friese+MA%2C+Craner+MJ%2C+Palace+J%2C+Newcombe+J%2C+Esiri+MM+et+al.+Interleukin-17+production+in+central+nervous+system-infiltrating+T+cells+and+glial+cells+is+associated+with+active+disease+in+multip>
145. Pender MP. Treating autoimmune demyelination by augmenting lymphocyte apoptosis in the central nervous system. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2016 Feb 18];191(1–2):26–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931708>
146. de Andrés C, Aristimuño C, de Las Heras V, Martínez-Ginés ML, Bartolomé M, Arroyo R, et al. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2016 Jan 20];182(1–2):204–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157927>
147. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* [Internet]. 2004 Apr 5 [cited 2016 Jan 10];199(7):971–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2211881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
148. Buc M. Role of Regulatory T Cells in Pathogenesis and Biological Therapy of Multiple Sclerosis. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Apr 26];2013:1–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3666288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
149. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* [Internet]. 2005 Nov [cited 2016 Apr 7];35(11):3343–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16206232>
150. Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H RC. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. - PubMed - NCBI. *J Immunol* [Internet]. 2001 [cited 2016 Apr 26];166(12):7579–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sun+myelin+antigen+specific+cd8+2001>
151. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* [Internet]. 2002 Oct [cited 2016 Feb 18];125(Pt 10):2202–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244078>
152. Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* [Internet]. 2001 Jun 15 [cited 2016 Feb 18];166(12):7579–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390514>

153. Johnson AJ, Suidan GL, McDole J PI. The CD8 T cell in multiple sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology? - PubMed - NCBI. *Int Rev Neurobiol* [Internet]. 2007 [cited 2016 Apr 26];79:73–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17531838>
154. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* [Internet]. 2004 May [cited 2016 Jan 31];14(2):164–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193029>
155. Obermeier B, Lovato L, Mentele R, Brück W, Forne I, Imhof A, et al. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Feb 18];233(1–2):245–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3090654&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
156. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Mar 25];13(2):139–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290272>
157. McLaughlin KA, Wucherpfennig KW. B cells and autoantibodies in the pathogenesis of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Adv Immunol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Feb 18];98:121–49. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4520528&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
158. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* [Internet]. 2007 Mar 15 [cited 2016 Apr 26];178(6):3447–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339439>
159. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Nov 30];2010. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2913853&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
160. Galdiero M, Galdiero M, Finamore E, Rossano F, Gambuzza M, Catania MR, et al. Haemophilus influenzae porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infect Immun* [Internet]. 2004 Feb [cited 2016 Feb 9];72(2):1204–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=321594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
161. Akira S, Sato S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis* [Internet]. 2003 Jan [cited 2016 Feb 9];35(9):555–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14620134>
162. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* [Internet]. 2004 Dec [cited 2016 Jan 15];10(12):1366–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558055>
163. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* [Internet]. 1999 Apr 29 [cited 2016 Feb 9];231(1–2):59–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10231569>
164. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* [Internet]. 2000 Dec 7 [cited 2015 Dec 9];408(6813):740–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130078>
165. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and

- activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* [Internet]. 2001 Oct 18 [cited 2015 Oct 31];413(6857):732–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11607032>
166. Thompson AJ V, Locarnini SA. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol* [Internet]. Jan [cited 2016 Apr 2];85(6):435–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667934>
167. Rasmussen SB, Reinert LS, Paludan SR. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *APMIS* [Internet]. 2009 May [cited 2016 May 6];117(5–6):323–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400860>
168. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* [Internet]. 2013 Sep [cited 2014 Sep 18];140(1):22–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3809702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
169. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2016 Feb 29];175(5):2851–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116171>
170. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* [Internet]. 2006 May 4 [cited 2015 Oct 30];441(7089):101–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625202>
171. Franchi L, McDonald C, Kanneganti T-D, Amer A, Núñez G. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J Immunol* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2016 May 6];177(6):3507–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951308>
172. Martínez A, Sánchez-Lopez M, Varadé J, Mas A, Martín MC, de Las Heras V, et al. Role of the MHC2TA gene in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 May 6];66(3):325–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1855999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
173. Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M, et al. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* [Internet]. 2005 May [cited 2016 May 6];37(5):486–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821736>
174. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C, Seyfferth A, Ramos-Medina R, Alonso B, et al. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Feb 18];10(6):e0128952. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4454618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
175. Rajasekharan S, Bar-Or A. From bench to MS bedside: challenges translating biomarker discovery to clinical practice. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2012 Jul 15 [cited 2016 Feb 18];248(1–2):66–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22381245>
176. Marta Tejera-Alhambra, Lidia Fernández-Paredes, Clara de Andrés SS-R. Multiple Sclerosis: Where do we go from here? - *European Medical Journal*. *Eur Med J* [Internet]. 2016;4(1):84–95. Available from: <http://emjreviews.com/therapeutic-area/neurology/multiple-sclerosis-where-do-we-go-from-here/>
177. Katsavos S, Anagnostouli M. Biomarkers in Multiple Sclerosis: An Up-to-Date Overview. *Mult Scler Int* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2013 [cited 2016 Aug 9];2013:340508. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401777>

178. Sellebjerg F, Börnsen L, Khademi M, Krakauer M, Olsson T, Frederiksen JL, et al. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology* [Internet]. 2009 Dec 8 [cited 2016 Feb 18];73(23):2003–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996075>
179. Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, Matsuse D, et al. Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Feb 18];8(4):e61835. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3630114&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
180. Berghmans N, Heremans H, Li S, Martens E, Matthys P, Sorokin L, et al. Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Feb 18];9:243. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3526473&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
181. Kothur K, Wienholt L, Brilot F, Dale RC. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review. *Cytokine* [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 Jan 19];77:227–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26463515>
182. Pranzatelli MR, Tate ED, Hoefgen ER, Swan JA, Colliver JA. Therapeutic down-regulation of central and peripheral B-cell-activating factor (BAFF) production in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *Cytokine* [Internet]. 2008 Oct [cited 2016 Feb 18];44(1):26–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675552>
183. Mahad DJ, Howell SJL, Woodroffe MN. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. BMJ Group; 2002 Apr [cited 2017 Jan 19];72(4):498–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909910>
184. Szczuciński A, Losy J. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 Apr 27];115(3):137–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295707>
185. Reichardt LF, Tomaselli KJ. Extracellular Matrix Molecules and their Receptors: Functions in Neural Development. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 1991 Mar [cited 2016 Jan 10];14(1):531–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2758225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
186. Graber JJ, Ford D, Zhan M, Francis G, Panitch H, Dhib-Jalbut S. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlations with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2016 Feb 18];185(1–2):168–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1894687&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
187. Franciotta D, Zardini E, Ravaglia S, Piccolo G, Andreoni L, Bergamaschi R, et al. Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid and serum of adult patients with acute disseminated encephalomyelitis. *J Neurol Sci*. 2006;247(2):202–7.
188. Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, et al. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 Mar [cited 2016 Mar 29];103(6):807–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=408141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
189. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The levels of chemokines CXCL8, CCL2 and CCL5 in multiple sclerosis patients are linked to the activity of the disease. *Eur J Neurol* [Internet]. 2005 Jan [cited

- 2016 Apr 1];12(1):49–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613147>
190. Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Jun 8 [cited 2017 Jan 19];96(12):6873–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359806>
191. Mahad DJ, Lawry J, Howell SJ, Woodroffe MN. Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Mult Scler*. 2003;9(2):189–98.
192. Hagman S, Raunio M, Rossi M, Dastidar P, Elovaara I. Disease-associated inflammatory biomarker profiles in blood in different subtypes of multiple sclerosis: prospective clinical and MRI follow-up study. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2011 May [cited 2016 Apr 27];234(1–2):141–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397339>
193. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* [Internet]. 2010 Apr [cited 2016 Apr 27];16(4):406–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3042885&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
194. Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The interleukin-10 levels as a potential indicator of positive response to interferon beta treatment of multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. 2006 Oct [cited 2016 Apr 27];108(7):644–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343740>
195. Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2003 Mar [cited 2016 Jan 30];35(3):277–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676542>
196. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* [Internet]. 1996 Apr 4 [cited 2016 Feb 18];380(6573):439–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8602242>
197. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* [Internet]. 1999 Jun [cited 2016 Feb 19];5(6):623–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371499>
198. Iacobaeus E, Amoudruz P, Ström M, Khademi M, Brundin L, Hillert J, et al. The expression of VEGF-A is down regulated in peripheral blood mononuclear cells of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Feb 19];6(5):e19138. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3089609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
199. Compston A, Zajicek J, Sussman J, Webb A, Hall G, Muir D, et al. Glial lineages and myelination in the central nervous system. *J Anat* [Internet]. 1997 Feb [cited 2016 Feb 18];190 ( Pt 2):161–200. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1467598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
200. Clemente D, Ortega MC, Arenzana FJ, de Castro F. FGF-2 and Anosmin-1 are selectively expressed in different types of multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Oct 19 [cited 2016 Feb 18];31(42):14899–909. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016523>

201. Magy L, Mertens C, Avellana-Adalid V, Keita M, Lachapelle F, Nait-Oumesmar B, et al. Inducible expression of FGF2 by a rat oligodendrocyte precursor cell line promotes CNS myelination in vitro. *Exp Neurol* [Internet]. 2003 Dec [cited 2016 Jan 15];184(2):912–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14769383>
202. Goddard DR, Berry M, Kirvell SL, Butt AM. Fibroblast growth factor-2 inhibits myelin production by oligodendrocytes in vivo. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2001 Nov [cited 2016 Jan 22];18(5):557–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922145>
203. Butt AM, Dinsdale J. Fibroblast growth factor 2 induces loss of adult oligodendrocytes and myelin in vivo. *Exp Neurol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2016 Feb 18];192(1):125–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15698626>
204. Rottlaender A, Villwock H, Addicks K, Kuerten S. Neuroprotective role of fibroblast growth factor-2 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology* [Internet]. 2011 Jul [cited 2016 Feb 4];133(3):370–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3112346&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
205. Scalabrino G, Galimberti D, Mutti E, Scalabrini D, Veber D, De Riz M, et al. Loss of epidermal growth factor regulation by cobalamin in multiple sclerosis. *Brain Res* [Internet]. 2010 May 28 [cited 2016 Feb 18];1333:64–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347721>
206. del Barco DG, Montero E, Coro-Antich RM, Brown E, Suarez-Alba J, Lopez L, et al. Coadministration of epidermal growth factor and growth hormone releasing peptide-6 improves clinical recovery in experimental autoimmune encephalitis. *Restor Neurol Neurosci* [Internet]. 2011 Jan [cited 2016 Feb 18];29(4):243–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697595>
207. Achim CL, Katyal S, Wiley CA, Shiratori M, Wang G, Oshika E, et al. Expression of HGF and cMet in the developing and adult brain. *Brain Res Dev Brain Res* [Internet]. 1997 Sep 20 [cited 2016 Feb 18];102(2):299–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9352114>
208. Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T. Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res* [Internet]. 1995 Sep [cited 2016 Feb 18];32(2):197–210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7500831>
209. Baek J-H, Birchmeier C, Zenke M, Hieronymus T. The HGF receptor/Met tyrosine kinase is a key regulator of dendritic cell migration in skin immunity. *J Immunol* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2016 Feb 18];189(4):1699–707. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22802413>
210. Kurz SM, Diebold SS, Hieronymus T, Gust TC, Bartunek P, Sachs M, et al. The impact of c-met/scatter factor receptor on dendritic cell migration. *Eur J Immunol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2016 Feb 18];32(7):1832–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12115601>
211. Adams DH, Harvath L, Bottaro DP, Interrante R, Catalano G, Tanaka Y, et al. Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Jul 19 [cited 2016 Feb 18];91(15):7144–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
212. van der Voort R, Taher TE, Keehn RM, Smit L, Groenink M, Pals ST. Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Jun 16 [cited 2016 Feb 18];185(12):2121–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2196350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

e=abstract

213. Müller AM, Jun E, Conlon H, Sadiq SA. Cerebrospinal hepatocyte growth factor levels correlate negatively with disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2016 Jan 14];251(1–2):80–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771249>
214. Tsuboi Y, Kakimoto K, Akatsu H, Daikuhara Y, Yamada T. Hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid in neurologic disease. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2002 Aug [cited 2016 Feb 18];106(2):99–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100369>
215. Boonacker E, Van Noorden CJF. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2016 Feb 19];82(2):53–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12647932>
216. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2009 Jun 26 [cited 2015 Nov 19];58(11):1723–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557413>
217. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpé S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* [Internet]. 1999 Aug [cited 2016 Feb 19];20(8):367–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10431157>
218. Hegen M, Niedobitek G, Klein CE, Stein H, Fleischer B. The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J Immunol* [Internet]. 1990 Apr 15 [cited 2016 Feb 19];144(8):2908–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1969875>
219. Zhong J, Rao X, Rajagopalan S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis* [Internet]. 2013 Feb [cited 2016 Feb 19];226(2):305–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23083681>
220. Mortier A, Gouwy M, Van Damme J, Proost P, Struyf S. CD26/dipeptidylpeptidase IV-chemokine interactions: double-edged regulation of inflammation and tumor biology. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2016 Jan 7 [cited 2016 Jan 26]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26744452>
221. Ou X, O’Leary HA, Broxmeyer HE. Implications of DPP4 modification of proteins that regulate stem/progenitor and more mature cell types. *Blood* [Internet]. 2013 Jul 11 [cited 2016 Apr 27];122(2):161–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709652&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
222. Riva A, Laird M, Casrouge A, Ambrozaitis A, Williams R, Naoumov N V, et al. Truncated CXCL10 is associated with failure to achieve spontaneous clearance of acute hepatitis C infection. *Hepatology* [Internet]. 2014 Aug [cited 2016 Feb 19];60(2):487–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668726>
223. Narikawa K, Misu T, Fujihara K, Nakashima I, Sato S, Itoyama Y. Soluble CD26 and CD30 levels in CSF and sera of patients with relapsing neuromyelitis optica. *J Neurol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2016 Feb 19];253(1):111–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021350>
224. Dang NH, Torimoto Y, Shimamura K, Tanaka T, Daley JF, Schlossman SF, et al. 1F7 (CD26): a marker of thymic maturation involved in the differential regulation of the CD3 and CD2 pathways of human thymocyte activation. *J Immunol* [Internet]. 1991 Nov 1 [cited 2016 Feb 19];147(9):2825–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717577>
225. Dang NH, Torimoto Y, Sugita K, Daley JF, Schow P, Prado C, et al. Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell



- activation. *J Immunol* [Internet]. 1990 Dec 15 [cited 2016 Feb 19];145(12):3963–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1979581>
226. Ibegbu CC, Xu Y-X, Fillos D, Radziejewicz H, Grakoui A, Kourtis AP. Differential expression of CD26 on virus-specific CD8(+) T cells during active, latent and resolved infection. *Immunology* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 Feb 19];126(3):346–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  227. Krakauer M, Sorensen PS, Sellebjerg F. CD4(+) memory T cells with high CD26 surface expression are enriched for Th1 markers and correlate with clinical severity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2016 Feb 19];181(1–2):157–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17081623>
  228. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Jul 5 [cited 2016 Feb 19];102(27):9583–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1172240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  229. Bengsch B, Seigel B, Flecken T, Wolanski J, Blum HE, Thimme R. Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J Immunol* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2016 Feb 19];188(11):5438–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539793>
  230. Waumans Y, Baerts L, Kehoe K, Lambeir A-M, De Meester I. The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 27];6:387. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4528296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  231. Chapel HM, Small M, Gregory S, Matthews WB. Serial studies of evoked potentials and circulating lymphocyte subsets for multiple sclerosis: attempts to monitor progress. *J Neurol* [Internet]. 1990 Aug [cited 2016 Feb 19];237(5):303–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2230845>
  232. Crockard AD, McNeill TA, McKirgan J, Hawkins SA. Determination of activated lymphocytes in peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1988 Jan [cited 2016 Feb 19];51(1):139–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1032729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  233. Jensen J, Langkilde AR, Fenst C, Nicolaisen MS, Roed HG, Christiansen M, et al. CD4 T cell activation and disease activity at onset of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2016 Feb 19];149(1–2):202–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15020081>
  234. Khoury SJ, Guttman CR, Orav EJ, Kikinis R, Jolesz FA, Weiner HL. Changes in activated T cells in the blood correlate with disease activity in multiple sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2000 Aug [cited 2016 Feb 19];57(8):1183–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10927799>
  235. Constantinescu CS, Kamoun M, Dotti M, Farber RE, Galetta SL, Rostami A. A longitudinal study of the T cell activation marker CD26 in chronic progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* [Internet]. 1995 Jun [cited 2016 Feb 19];130(2):178–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586983>
  236. Hafler DA, Fox DA, Manning ME, Schlossman SF, Reinherz EL, Weiner HL. In vivo activated T

- lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 1985 May 30 [cited 2016 Feb 19];312(22):1405–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2985995>
237. Jensen J, Langkilde AR, Frederiksen JL, Sellebjerg F. CD8+ T cell activation correlates with disease activity in clinically isolated syndromes and is regulated by interferon-beta treatment. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2016 Feb 1];179(1–2):163–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16919783>
238. Sellebjerg F, Krakauer M, Limborg S, Hesse D, Lund H, Langkilde A, et al. Endogenous and recombinant type I interferons and disease activity in multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Feb 19];7(6):e35927. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3368920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
239. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C, Ramos-Medina R, Alonso B, Vega J, et al. Low DPP4 expression and activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2016 Apr 27];150(2):170–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412911>
240. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andres C, Seyfferth A, Ramos-Medina R, Alonso B, et al. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128952.
241. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung H-P, Miller DH, et al. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2007 Aug 4 [cited 2016 Apr 26];370(9585):389–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17679016>
242. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* [Internet]. 1998 Sep [cited 2016 Apr 26];51(3):682–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748010>
243. Karp CL, Biron CA, Irani DN. Interferon beta in multiple sclerosis: is IL-12 suppression the key? *Immunol Today* [Internet]. 2000 Jan [cited 2016 Apr 26];21(1):24–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637555>
244. Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquill LR, Maloni H, McFarland HF. VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* [Internet]. 1997 Oct [cited 2016 Apr 26];49(4):1111–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9339698>
245. Ochi H, Feng-Jun M, Osoegawa M, Minohara M, Murai H, Taniwaki T KJ. Time-dependent cytokine deviation toward the Th2 side in Japanese multiple sclerosis patients with interferon beta-1b. - PubMed - NCBI. *J Neurol Sci* [Internet]. 2004 [cited 2016 Apr 26];222(1–2):65–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240198>
246. Fridkis-Hareli M SJ. Promiscuous binding of synthetic copolymer 1 to purified HLA-DR molecules. - PubMed - NCBI. *J Immunol* [Internet]. 1998 [cited 2016 Apr 26];160(9):4386–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9574543>
247. Schmied M, Duda PW, Krieger JJ, Trollmo C, Hafler DA. In vitro evidence that subcutaneous administration of glatiramer acetate induces hyporesponsive T cells in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol* [Internet]. 2003 Mar [cited 2016 Apr 26];106(3):163–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706402>
248. Kim HJ, Biernacki K, Prat A, Antel JP, Bar-Or A. Inflammatory potential and migratory capacities across human brain endothelial cells of distinct glatiramer acetate-reactive T cells generated in treated multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* [Internet]. 2004 Apr [cited 2016 Apr 26];111(1):38–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093550>

249. Bar-Or A, Pachner A, Menguy-Vacheron F, Kaplan J, Wiendl H. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs* [Internet]. Springer; 2014 Apr [cited 2016 Aug 9];74(6):659–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740824>
250. Nicholas JA, Boster AL, Imitola J, O'Connell C, Racke MK. Design of oral agents for the management of multiple sclerosis: benefit and risk assessment for dimethyl fumarate. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. Dove Press; 2014 [cited 2016 Aug 9];8:897–908. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045248>
251. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* [Internet]. 1992 Mar 5 [cited 2016 Apr 2];356(6364):63–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1538783>
252. 2005 - FDA Issues Public Health Advisory on Tysabri, a New Drug for MS [Internet]. [cited 2016 Apr 27]. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2005/ucm108413.htm>
253. Jones JL, Coles AJ. New treatment strategies in multiple sclerosis. *Exp Neurol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2016 Apr 27];225(1):34–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547155>
254. Miquelajauregui Villanueva A. [http://miquelajauregui.blogspot.com.es/2012/04/esclerosis-multiple\\_11.html](http://miquelajauregui.blogspot.com.es/2012/04/esclerosis-multiple_11.html).
255. Sanitarios A española de medicamentos y productos. Informe de Posicionamiento Terapéutico de alemtuzumab (Lemtrada®) [Internet]. [cited 2016 Apr 27]. Available from: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-alemtuzumab-lemtrada.pdf>
256. Martinelli Boneschi F, Rovaris M, Capra R CG. Mitoxantrona para la esclerosis múltiple (Revisión Cochrane traducida). *Bibl Cochrane Plus*. 2008;3.
257. Bielekova B. Daclizumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2013 Jan 5 [cited 2017 Feb 25];10(1):55–67. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13311-012-0147-4>
258. Comabella M, Montalban X, Münz C, Lünemann JD. Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2016 Feb 9];6(9):499–507. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20717105>
259. Gross CC, Jonuleit H, Wiendl H. Fulfilling the dream: tolerogenic dendritic cells to treat multiple sclerosis. *Eur J Immunol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Feb 9];42(3):569–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488360>
260. Derkow K, Bauer JMJ, Hecker M, Paap BK, Thamilarasan M, Koczan D, et al. Multiple sclerosis: modulation of toll-like receptor (TLR) expression by interferon- $\beta$  includes upregulation of TLR7 in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Feb 23];8(8):e70626. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3741212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
261. Inoue M, Shinohara ML. The role of interferon- $\beta$  in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis - in the perspective of inflammasomes. *Immunology* [Internet]. 2013 May [cited 2016 Feb 4];139(1):11–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3634535&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
262. Aung LL, Fitzgerald-Bocarsly P, Dhib-Jalbut S, Balashov K. Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: chemokine and chemokine receptor modulation by interferon-beta. *J*

- Neuroimmunol [Internet]. 2010 Sep 14 [cited 2016 Feb 23];226(1–2):158–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2937086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
263. Sweeney CM, Loneragan R, Basdeo SA, Kinsella K, Dungan LS, Higgins SC, et al. IL-27 mediates the response to IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2011 Aug [cited 2016 Feb 23];25(6):1170–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420486>
264. O'Neill LAJ, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic Targeting of Toll-Like Receptors for Infectious and Inflammatory Diseases and Cancer. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2009 May 27 [cited 2016 Jan 10];61(2):177–97. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2846156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
265. Connolly DJ, O'Neill LAJ. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2016 Feb 23];12(4):510–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748800>
266. Hayashi T, Gray CS, Chan M, Tawatao RI, Ronacher L, McGargill MA, et al. Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Feb 24 [cited 2016 Feb 23];106(8):2764–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2634806&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
267. WHO | ICD-11 Revision. WHO. World Health Organization; 2017;
268. Casrouge A, Bisiaux A, Stephen L, Schmolz M, Mapes J, Pfister C, et al. Discrimination of agonist and antagonist forms of CXCL10 in biological samples. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Nov 17];167(1):137–48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2011.04488.x>
269. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1988 Feb 11 [cited 2016 Jun 16];16(3):1215. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216>
270. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2016 Jun 16];26(5):589–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080505>
271. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* [Internet]. 2010 Sep [cited 2016 Jun 16];20(9):1297–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644199>
272. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2016 Jun 16];25(16):2078–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19505943>
273. <http://picard.sourceforge.net>.
274. <https://www.t1dbase.org/page/Welcome/display>.
275. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> [Internet]. Available from: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
276. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* [Internet]. 2010;42(11):937–48. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20935630](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20935630)

277. Miyake M, Ooto S, Yamashiro K, Takahashi A, Yoshikawa M, Akagi-Kurashige Y, et al. Pachychoroid neovasculopathy and age-related macular degeneration. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Nov 6 [cited 2016 Dec 20];5:16204. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep16204>
278. Lin X, Song K, Lim N, Yuan X, Johnson T, Abderrahmani A, et al. Risk prediction of prevalent diabetes in a Swiss population using a weighted genetic score--the CoLaus Study. *Diabetologia* [Internet]. 2009 Apr 13 [cited 2016 Dec 20];52(4):600–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-008-1254-y>
279. Organization WH. NEUROLOGICAL DISORDERS: public health challenges. 2006.
280. Siddiqui I, Aleem S, Kayani N, Baig S. CSF oligoclonal bands in multiple sclerosis. *J Pak Med Assoc* [Internet]. 2002 Aug [cited 2017 Feb 7];52(8):351–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481674>
281. Herx LM, Yong VW. Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2001 Oct [cited 2017 Jan 16];60(10):961–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11589427>
282. Hauser SL, Doolittle TH, Lincoln R, Brown RH, Dinarello CA. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* [Internet]. 1990 Nov [cited 2017 Jan 16];40(11):1735–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2234430>
283. Brosnan CF, Cannella B, Battistini L, Raine CS. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* [Internet]. 1995 Jun [cited 2017 Jan 16];45(6 Suppl 6):S16-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540265>
284. Distler JHW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* [Internet]. 2003 Sep [cited 2017 Jan 16];47(3):149–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897707>
285. Frost EE, Nielsen JA, Le TQ, Armstrong RC. PDGF and FGF2 regulate oligodendrocyte progenitor responses to demyelination. *J Neurobiol* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2017 Jan 16];54(3):457–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/neu.10158>
286. Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2017 Jan 16];174(11):6571–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905493>
287. Guimond M, Veenstra RG, Grindler DJ, Zhang H, Cui Y, Murphy RD, et al. Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2009 Feb 11 [cited 2017 Feb 26];10(2):149–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136960>
288. Barreira da Silva R, Laird ME, Yatim N, Fiette L, Ingersoll MA, Albert ML. Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy. *Nat Immunol* [Internet]. 2015 Jun 15 [cited 2017 Jan 19];16(8):850–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26075911>
289. Kobayashi H, Hosono O, Mimori T, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, et al. Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2002 Sep [cited 2017 Jan 19];29(9):1858–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12233879>
290. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2009 Nov 26 [cited 2017 Jan 19];58(11):1723–47. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-009-0728-1>

291. Jensen J, Langkilde AR, Frederiksen JL, Sellebjerg F. CD8+ T cell activation correlates with disease activity in clinically isolated syndromes and is regulated by interferon-beta treatment. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2017 Jan 19];179(1–2):163–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572806002608>
292. Kim SC, Schneeweiss S, Glynn RJ, Doherty M, Goldfine AB, Solomon DH. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes may reduce the risk of autoimmune diseases: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2015 Nov [cited 2017 Jan 19];74(11):1968–75. Available from: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2014-205216>
293. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C, Ramos-Medina R, Alonso B, Vega J, et al. Low DPP4 expression and activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2017 Jan 19];150(2):170–83. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661613003136>
294. Guo H, Fang C, Huang Y, Pei Y, Chen L, Hu J. The efficacy and safety of DPP4 inhibitors in patients with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2016 Nov [cited 2017 Feb 7];121:184–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27741478>
295. Sinnathurai P, Lau W, Vieira de Ribeiro AJ, Bachovchin WW, Englert H, Howe G, et al. Circulating fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase 4 in rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis* [Internet]. 2016 Dec 19 [cited 2017 Feb 7]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27990763>
296. Bjelke JR, Christensen J, Nielsen PF, Branner S, Kanstrup AB, Wagtman N, et al. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J* [Internet]. Portland Press Ltd; 2006 Jun 1 [cited 2017 Jan 21];396(2):391–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475979>
297. Tsunoda I, Lane TE, Blackett J, Fujinami RS. Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis: implication of differing roles for IP-10. *Mult Scler* [Internet]. 2004 Feb [cited 2017 Jan 19];10(1):26–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760949>
298. Buttmann M, Merzyn C, Rieckmann P. Interferon-beta induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2004 Nov [cited 2017 Jan 19];156(1–2):195–203. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572804002735>
299. Lundström W, Hermanrud C, Sjöstrand M, Brauner S, Wahren-Herlenius M, Olsson T, et al. Interferon beta treatment of multiple sclerosis increases serum interleukin-7. *Mult Scler* [Internet]. 2014 Nov [cited 2016 Jun 16];20(13):1727–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821684>
300. <http://string-db.org>.
301. Zhang S-Y, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, et al. TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science* (80- ) [Internet]. 2007 Sep 14 [cited 2017 Feb 7];317(5844):1522–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17872438>
302. Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2017 Feb 26];38(4):921–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395861>
303. Blass JP. The cultured fibroblast model. *J Neural Transm Suppl* [Internet]. 1994 [cited 2017 Jan 19];44:87–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7897402>
304. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the

- human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2002 Nov [cited 2017 Jan 21];61(11):1013–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12430718>
305. Saresella M, Gatti A, Tortorella P, Marventano I, Piancone F, La Rosa F, et al. Toll-like receptor 3 differently modulates inflammation in progressive or benign multiple sclerosis. *Clin Immunol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Jan 20];150(1):109–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24334148>
306. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Jan 20];14(2):183–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147444221470256X>
307. Touil T, Fitzgerald D, Zhang G-X, Rostami A, Gran B. Cutting Edge: TLR3 stimulation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing endogenous IFN-beta. *J Immunol* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2017 Jan 20];177(11):7505–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114417>
308. Pintér C, Beltrami S, Caputo D, Ferrante P, Clivio A. Presence of autoantibodies against complement regulatory proteins in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurovirol* [Internet]. 2000 May [cited 2017 Jan 21];6 Suppl 2:S42–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871784>
309. van Noort JM, Bajramovic JJ, Plomp AC, van Stipdonk MJ. Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2000 Jun 1 [cited 2017 Jan 21];105(1):46–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713363>
310. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) AH, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kemppinen A, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Nov 29 [cited 2017 Jan 24];45(11):1353–60. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng.2770>
311. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2002 Apr 6 [cited 2017 Jan 21];359(9313):1221–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360208220X>

---

**ANEXOS**



**ANEXO I.**

Clasificación y proporción de las enfermedades incluidas en este estudio como controles en el grupo de otras enfermedades neurológicas, no inflamatorias (ENNI) e inflamatorias (ENI).

Grupo	Condición	Nº de individuos
ENNI	<b>Enfermedades vasculares</b>	
	Ataques isquémicos, infartos	4
	<b>Enfermedades neurodegenerativas</b>	
	ELA	22
	<b>Inconsciencias</b>	
	Epilepsia no inflamatoria	2
ENI	<b>Afectación SN periférico</b>	
	Radiculopatía (hernia)	1
	<b>Alteraciones en el flujo del LCR</b>	
	Hipertensión intracraneal benigna	7
	<b>Demencias y enfermedad de Parkinson</b>	21
	<b>Enfermedades infecciosas</b>	
	Toxoplasmosis cerebral	1
	<b>Enfermedades neurológicas autoinmunes</b>	
	Enfermedad de Sjögren	2
	Neurosarcoidosis	3
	Encefalomielitis diseminada aguda/multifásica	9
	Neuromielitis óptica	4
	<b>Síndromes paraneoplásicos</b>	3
	<b>Encefalitis aséptica o mielitis</b>	7
	<b>Meningitis aséptica</b>	9

## ANEXO II

Publicaciones generadas durante el desarrollo de la tesis doctoral.

**Fernández-Paredes, L, Casrouge, A, Decalf, J, de Andrés, C, Villar, L M, Pérez de Diego, R, Alonso, B, Álvarez Cermeño, J C, Arroyo, R, Tejera-Alhambra, M, Navarro, J, Oreja-Guevara, C, López Trascasa, M, Seyfferth, A, García Martínez, M A, Álvarez Lafuente, R, Albert, M L and Sánchez-Ramón, S.** Multimarker Risk Stratification Approach at Multiple Sclerosis Onset. **Clinical Immunology** (in press).

de Andrés C†, **Fernández-Paredes L†**, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Ramos-Medina R, and Sánchez-Ramón S. Activation of Blood CD3+CD56+CD8+ T Cells during Pregnancy and Multiple Sclerosis. **Front. Immunol.** 23 February 2017.

**Fernández-Paredes L, Tejera-Alhambra M., de Andrés C, Sánchez-Ramón S.** Thinking Outside the Brain: Immunoregulation in Multiple Sclerosis. **Current Immunology Reviews.** 2017 Jan; 12(2):98-111. Review.

**Fernández-Paredes L, de Diego RP, de Andrés C, Sánchez-Ramón S.** Close Encounters of the First Kind: Innate Sensors and Multiple Sclerosis. **Mol Neurobiol.** 2017 Jan; 54(1):101-114. Review.

*International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*1, Lill CM, Schjeide BM, Graetz C, Ban M, Alcina A, Ortiz MA, Pérez J, Damotte V, Booth D, Lopez de Lapuente A, Broer L, Schilling M, Akkad DA, Aktas O, Alloza I, Antigüedad A, Arroyo R, Blaschke P, Buttmann M, Chan A, Compston A, Cournu-Rebeix I, Dörner T, Epplen JT, Fernández Ó, Gerdes LA, Guillot-Noël L, Hartung HP, Hoffjan S, Izquierdo G, Kemppinen A, Kroner A, Kubisch C, Kümpfel T, Li SC, Lindenberger U, Lohse P, Lubetzki C, Luessi F, Malhotra S, Mescheriakova J, Montalban X, Papeix C, **Paredes LF**, Rieckmann P, Steinhagen-Thiessen E, Winkelmann A, Zettl UK, Hintzen R, Vandenbroeck K, Stewart G, Fontaine B, Comabella M, Urcelay E, Matesanz F, Sawcer S, Bertram L, Zipp F. MANBA, CXCR5, SOX8, RPS6KB1 and ZBTB46 are genetic risk loci for multiple sclerosis. **Brain.** 2013 Jun;136(Pt 6):1778-82.